

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Espectrometria de Massas de Alta Resolução acoplada a
Espectrometria Mobilidade Iônica para análise de matrizes
complexas**

**High Resolution Mass Spectrometry coupled to Ion Mobility Spectrometry for the
analysis of Complex Matrix**

Lilian Valadares Tose

Tese de Doutorado em Química

**Vitória
2018**

Lilian Valadares Tose

**Espectrometria de Massas de Alta Resolução acoplada a
Espectrometria Mobilidade Iônica para análise de matrizes
complexas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Química.

Área de Concentração: Química Analítica

Linha de Pesquisa: Química Forense/
Química do Petróleo e Biocombustíveis

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Romão

**VITÓRIA
2018**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

T714e Tose, Lilian Valadares, 1988-
Espectrometria de massas de alta resolução acoplada a
espectrometria mobilidade iônica para análise de matrizes
complexas / Lilian Valadares Tose. – 2018.
120 f. : il.

Orientador: Wanderson Romão.
Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do
Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas.

1. Espectrometria de massa. 2. Mobilidade iônica. 3.
Canabinóides. 4. Petróleo. 5. Matéria orgânica. I. Romão,
Wanderson. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de
Ciências Humanas e Naturais. III. Título.

CDU: 54

Elaborado por Perla Rodrigues Lôbo – CRB-6 ES-527/O

Espectrometria de Massas de Alta Resolução acoplada a
Espectrometria Mobilidade Iônica para análise de matrizes complexas

Lilian Valadares Tose

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências
Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a
obtenção do Grau de Doutora em Química.

Aprovado em 16/08/2018 por:



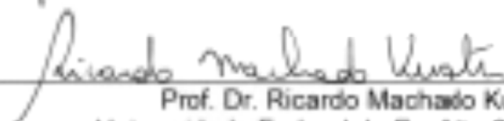
Prof. Dr. Wanderson Romão
Instituto Federal do Espírito Santo/Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador



Prof. Dr. Francisco A. Fernandez-Lima
FIU-Florida International University



Prof. Dra. Prof. Glória Maria de F. Viçgas Aquino
Instituto Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Alvaro Cunha Neto
Universidade Federal do Espírito Santo

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, agosto de 2018

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu refúgio e abrigo em todos momentos.

Aos meus pais, Maria Laura e Valter, por serem a força que me move. Obrigada pelo amor, carinho e orações. Também a gradeço a toda minha família, tios, avós e primos. Vocês são minha fortaleza e alicerce.

A Fábio, pelo apoio e confiança durante esse período.

Ao orientador, Prof. Dr. Wanderson Romão, grande incentivador e aquele que sempre acreditou em mim. Obrigada pelos conselhos e ensinamentos. “Sempre guarde o que há de melhor das pessoas” por Wanderson Romão.

Aos amigos do laboratório, pessoas inesquecíveis que fazem a rotina mais leve. Poderia descrever várias qualidades de cada um, mas isso me custariam várias páginas. A vocês meu muito obrigada: Lindamara, Gabi, Fernanda, Heloa, Radigya, Nayara, Flávia, Heloisa, Eliane, Rayana, Larissa, Mariana, Camila, Gabriela, Daniele, Bruno, Eloilson, Adriel, Clebson e João. Vocês são incríveis.

I would like to say thank you to Dr. Francisco Fernandez-Lima for receiving me as his student for more than a year. Everything you taught me was an important step to get my PhD. I am glad to have been together with amazing people. I glad to have made friends at FIU: Alyssa, Kendra, Paolo, Dennys, Kevin, David, Camilo, Allan, Jacob, Anthony, César and Mario.

I would like to say thank you to my roommates, Natalia and Ludmyla. Forever we will be three musketeers.

Ao PPGQUI, UFES, NCQP, CAPES, FAPES e WATERS por todo apoio prestado na minha formação.

E todos que me incentivaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

**“Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum,
porque tu estás comigo.”**

Salmo 23:4

**“Mude, mas comece devagar, porque a direção é mais importante que a
velocidade.”**

Clarice Lispector

Publicações relacionadas ao tema de estudo

Para submissão:

- ✓ **Lilian V. Tose**, Paolo Benigni, Dennys Leyva, Abigail Sundberg, César E. Ramírez, Mark E. Ridgeway, Melvin A. Park, Wanderson Romão, Rudolf Jaffé, Francisco Fernandez-Lima. Analysis of Dissolved Organic Matter from Subtropical Wetlands using tandem Trapped Ion Mobility Spectrometry and FT-ICR MS. **Environmental Science & Technology**.

Primeiro autor:

1. **Lilian V. Tose**, Paolo Benigni, Dennys Leyva, Abigail Sundberg, César E. Ramírez, Mark E. Ridgeway, Melvin A. Park, Wanderson Romão, Rudolf Jaffé, Francisco Fernandez-Lima. Coupling Trapped Ion Mobility Spectrometry to Mass Spectrometry: TIMS-TOF MS vs TIMS-FT-ICR MS. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 2018.
2. **Lilian V. Tose**, M. Murgu, Boniek G. Vaz, Wanderson Romão. Application of Atmospheric Solids Analysis Probe Mass Spectrometry (ASAP-MS) in Petroleomics: Analysis of Condensed Aromatics Standards, Crude Oil, and Paraffinic Fraction. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 29, p. 1-7, 2017.
3. **Lilian V. Tose**, Nayara A. Santos, Rayza R. T. Rodrigues, Michael Murgu, Alexandre F. Santos, Géssica A. Vasconcelos, Paulo T. C. Souza, Boniek G. Vaz, Wanderson Romão. Isomeric Separation of Cannabinoids by UPLC combined with Ionic Mobility Mass Spectrometry (TWIMS-MS); part I. **International Journal of Mass Spectrometry**, 2016.
4. **Lilian V. Tose**, Felipe M. R. Cardoso, Felipe P. Fleming, Maristela A. Vicente, Samantha R. C. Silva, Gloria M. F. V. Aquije, Boniek G. Vaz, Wanderson Romão. Analyzes of hydrocarbons by atmosphere pressure chemical ionization FT-ICR mass spectrometry using isooctane as ionizing reagent. **Fuel** (Guildford), v. 153, p. 346-354, 2015.

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Padrões AC analisados por ASAP(+) MS.....	36
Tabela 3.1 Parâmetros da fonte de ESI e Célula de mobilidade iônica.....	47
Tabela 3.2 Valores medidos e teóricos para m/z , formula molecular e tempo de retenção em amostras de haxixe por UPLC-ESI(\pm)-TOF MS.....	49
Tabela 3.3 Poder de resolução (R_p), fatos de separação (α) e resolução pico-a-pico (R_{p-p}) obtidos por dados de TWIMS-MS.....	54
Tabela 4.1 Resumo de fórmulas químicas e CCS (N_2) na faixa de m/z 201.....	67
Tabela 4.2 Resumo de fórmulas químicas e CCS (N_2) na faixa de m/z 211.....	69
Tabela 4.3 Fórmulas químicas e CCS (N_2) na faixa de m/z 465.....	71
Tabela 5.1 Fórmulas Químicas e valores de CCS em m/z 201.....	93
Tabela 5.2 Fórmulas Químicas e valores de CCS em m/z 211.....	95
Tabela 5.3 Fórmulas Químicas e valores de CCS em m/z 223.....	97
Tabela 5.4 Fórmulas Químicas e valores de CCS em m/z 241.....	98
Tabela 5.5 Fórmulas Químicas e valores de CCS em m/z 283.....	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Esquema da fonte de ESI.....	23
Figura 1.2 Esquema da fonte de ASAP.....	25
Figura 1.3 Analisador Quadrupolo (Q)	26
Figura 1.4 Esquema do FT-ICR MS.....	27
Figura 2.1 Imagens para a) Sistema ASAP(+)-MS; b) sonda para fonte de ionização ASAP; c) Mecanismos de ionização por protonação ($[M+H]^+$) e transferência de elétrons ($[M]^{*+}$).....	34
Figura 2.2 Compostos padrões de AC analisados por ASAP(+) MS.....	35
Figura 2.3 Espectros por ASAP(+) MS para o óleo bruto em diferentes temperaturas e as regiões resultantes da integração entre as temperaturas: k) 400 a 600 °C; L) 150 a 300 °C.....	37
Figura 2.4 ASAP(+)-MS para óleo bruto adquirido por aquecimento isotérmico a 400 °C.....	38
Figura 2.5 ASAP(+)-MS para amostras de parafina a diferentes temperaturas.....	39
Figura 2.6 Espectro por ASAP(+)-MS para parafina A em temperatura constante de 350 °C.....	39
Figura 3.1 Estrutura química dos principais isômeros do (a) Δ^9 - <i>trans</i> -THC-C ₅ ; (b) Δ^9 -THCA-C ₅ ; e (c) CBN-C ₅	42
Figura 3.2 Cromatogramas de uma típica amostra de haxixe por (a) UPLC-ESI(+)-TOF MS, e (b) UPLC-ESI(-)-TOF MS.....	48
Figura 3.3 Cromatogramas por UPLC-ESI(±)-TOF MS no modo SIM para os íons (a) m/z 311; (b) m/z 315 e (c) m/z 357.....	50
Figura 3.4 Cromatogramas por UPLC-ESI(+)-TOF MS e UPLC-ESI(-)-TOF MS para os extratos de haxixe ((a) e (d)), e partes da planta <i>Cannabis sativa</i> L.: flor ((b) e (e)), e folha ((c) e (f)).....	51
Figura 3.5 Cromatogramas por UPLC-ESI(±)-TOF MS para cinco amostras de rua de maconha.....	53
Figura 3.6 O perfil de mobilidade para os íons m/z (a) 357 e (b) 313 obtidos por ESI(-)-TWIMS-MS. Em ambos casos é notável a separação isomérica de três compostos.....	55
Figura 3.7 Os perfis de mobilidade para os íons m/z (a) 311 e (b) 315 obtidos por ESI(+)-TWIMS-MS.....	56
Figura 4.1 Esquema do analisador TIMS.....	60

Figura 4.2 Gráficos de contorno 2D-TIMS-MS e projeções MS para SRFA obtidos por TIMS-FT-ICR MS (esquerda) e TIMS-TOF MS (direita).....	63
Figura 4.3 Gráficos de contorno 2D-TIMS-MS, projeções MS e IMS usando TIMS-FT-ICR MS (a, c, e, g, i, k) e TIMS-TOF MS (b, d, f, h, j, l) para m/z 301 e 601 a partir do Tuning Mix.....	64
Figura 4.4 Gráfico de distribuição de classes oxigenadas (a) e Diagrama de Van Krevelen obtidos das análises do SRFA usando TIMS-TOF MS (b) e TIMS-FT-ICR MS (c).....	65
Figura 4.5 Gráficos de contorno 2D-TIMS-MS, projeções MS e IMS para SRFA usando TIMS-FT-ICR MS (a, c, e) e TIMS-TOF MS (b, d, f) em m/z 201. Perfis de mobilidade para os padrões isoméricos ($[M-H]^+$): ácido 2-metoxi-1-naftóico (g), ácido 3-metoxi-2-naftóico (f) e ácido 4-metoxi-1-naftóico (l). Observe a presença do íon $[C_{12}H_9O_3]^+$ da análise do SRFA, cujo as bandas de mobilidade possuem valores de CCS semelhante aos padrões.....	66
Figura 4.6 Gráfico de contorno 2D-TIMS-MS, projeções MS e IMS para SRFA usando TIMS-FT-ICR MS (a, c, e) e TIMS-TOF MS (b, d, f) em m/z 211. Perfis de mobilidade para os padrões isoméricos ($[M-H]^+$): ácido 2,4,5-trimetoxibenzóico (g) e propil galato (h). Observe a presença do íon $[C_{10}H_{11}O_5]^+$ da análise do SRFA, cujo as bandas de mobilidade possuem valores de CCS semelhante aos padrões.....	68
Figura 4.7 Gráfico de contorno 2D-TIMS-MS, projeções MS e IMS para SRFA usando TIMS-FT-ICR MS (a, c, e) e TIMS-TOF MS (b, d, f) em m/z 465.....	70
Figura 4.8 Distribuição das classes oxigenadas em função do DBE (a; b) e CCS (c; d) para SRFA usando TIMS-FT-ICR MS (esquerda) e TIMS-TOF MS (direita).....	72
Figura 4.9 Distribuição das classes oxigenadas em função do m/z vs CCS usando TIMS-FT-ICR MS.....	73
Figura 4.10 Distribuição das classes oxigenadas em função do m/z vs CCS usando TIMS-TOF MS.....	74
Figura 4.11 Distribuição das classes oxigenadas em função do m/z vs DBE usando TIMS-FT-ICR MS.....	75
Figura 4.12 Distribuição das classes oxigenadas em função do m/z vs DBE usando TIMS-TOF MS.....	76
Figura 5.1 Gráficos de contorno 2D-TIMS MS e espectros MS para amostras de DOM obtidos por TIMS-FT-ICR MS: OKA-L; PAN-L; FCE-L (esquerda); e OKA-S; PAN-S; FCE-S(direita).....	83

Figura 5.2 Gráfico de distribuição de classes (a) Fórmula Química; (b) Número de compostos por mobilidade.....	84
Figura 5.3 Projeções individuais por IMS-MS para cada amostra: OKA-L, PAN-L, FCE-L (esquerda); OKA-S, PAN-S, FCE-S (meio); compostos em comum entre os pares de amostras (direita).....	85
Figura 5.4 Gráficos de Van Krevelen obtidos das análises de DOM usando TIMS-FT-ICR MS.....	86
Figura 5.5 Distribuição de compostos heteroatômicos para análises de DOM em função do DBE.....	87
Figura 5.6. Distribuição dos compostos heteroatômicos para análises de DOM em função do CCS.....	88
Figura 5.7. Perfis de mobilidade para os padrões: ácido 2,4,5-trimetoxibenzóico (a); propil galato (b); ácido 2-metoxi-1-naftóico (c); ácido 3-metoxi-2-naftóico (d); ácido 4-metoxi-1-naftóico (e); ácido dicitclohexil acético (f); ácido pentadecanóico (g); e ácido esteárico (h).....	89
Figura 5.8 Espectros por MS e IMS para as análises de OKA-L e OKA-S para os íons (a) m/z 201; (b) m/z 211. * Padrões projetados: a) ácido 2-metoxi-1-naftóico ($157,5 \text{ \AA}^2$); ácido 3-metoxi-2-naftóico ($158,9 \text{ \AA}^2$) e ácido 4-metoxi-1-naftóico ($159,1 \text{ \AA}^2$), para o íon $[\text{C}_{12}\text{H}_9\text{O}_3]^-$; *Observe a sobreposição dos padrões com no segundo e o última sinais de mobilidade $[\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_5]^-$ em b) propil galato (143 \AA^2); ácido 2,4,5-trimetoxibenzóico (163 \AA^2).....	90
Figura 5.9 Espectros por MS e IMS para as análises de PAN-L e PAN-S para os íons (a) m/z 201; (b) m/z 211. * Padrões projetados: a) ácido 2-metoxi-1-naftóico ($157,5 \text{ \AA}^2$); ácido 3-metoxi-2-naftóico ($158,9 \text{ \AA}^2$) e ácido 4-metoxi-1-naftóico ($159,1 \text{ \AA}^2$), para o íon $[\text{C}_{12}\text{H}_9\text{O}_3]^-$; *Observe a sobreposição dos padrões com no segundo e o última sinais de mobilidade $[\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_5]^-$ em b) propil galato (143 \AA^2); ácido 2,4,5-trimetoxibenzóico (163 \AA^2).....	91
Figura 5.10 Espectros por MS e IMS para as análises de FCE-L e FCE-S para os íons (a) m/z 201; (b) m/z 211. * Padrões projetados: a) ácido 2-metoxi-1-naftóico ($157,5 \text{ \AA}^2$); ácido 3-metoxi-2-naftóico ($158,9 \text{ \AA}^2$) e ácido 4-metoxi-1-naftóico ($159,1 \text{ \AA}^2$), para o íon $[\text{C}_{12}\text{H}_9\text{O}_3]^-$; *Observe a sobreposição dos padrões com no segundo e o última sinais de mobilidade $[\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_5]^-$ em b) propil galato (143 \AA^2); ácido 2,4,5-trimetoxibenzóico (163 \AA^2).....	92

Figura 5.11 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e DBE para OKA-L por TIMS-FT-ICR MS.....	109
Figura 5.12 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e DBE para OKA-S por TIMS-FT-ICR MS.....	110
Figura 5.13 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e DBE para PAN-L por TIMS-FT-ICR MS.....	111
Figura 5.14 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e DBE para PAN-S por TIMS-FT-ICR MS.....	112
Figura 5.15 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e DBE para FCE-L por TIMS-FT-ICR MS.....	113
Figura 5.16 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e DBE para FCE-S por TIMS-FT-ICR MS.....	114
Figura 5.17 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e CCS para OKA-L por TIMS-FT-ICR MS.....	115
Figura 5.18 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e CCS para OKA-S por TIMS-FT-ICR MS.....	116
Figura 5.19 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e CCS para PAN-L por TIMS-FT-ICR MS.....	117
Figura 5.20 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e CCS para PAN-S por TIMS-FT-ICR MS.....	118
Figura 5.21 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e CCS para FCE-L por TIMS-FT-ICR MS.....	119
Figura 5.22 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e CCS para FCE-S por TIMS-FT-ICR MS.....	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC - Aromáticos condensados

AP/LIAD-CI - *Atmospheric pressure laser-induced acoustic desorption chemical ionization*

API – *Atmospheric pressure ionization*

ASAP - *Atmospheric pressure solid analysis probe*

CBC - Canabicromeno

CBD - Canabidiol

CBF - Canabifurano

CBL - Canabiciolol

CBN – Canabinol

CBND - Canabinodiol

CCS - *Collision cross section*

CID - *Collision induced dissociation*

DART - *Direct Analysis in Real Time*

DBE - *Double bond equivalent*

DESI - *Desorption Electrospray ionization*

DOM - *Dissolved organic matter*

EASI - *Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry*

ESI - *Electrospray ionization*

FCE - *Florida Coastal Everglades*

FT-ICR – *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*

GC-MS – *Gas chromatography coupled mass spectrometry*

ICT - *Ion accumulation time*

IMS – *Ion mobility spectrometry*

K - Mobilidade

LC - *Liquid chromatography*

LIAD - *Laser-induced acoustic desorption*

LTP - *Low-temperature plasma*

m/z - massa/carga

MALDI-IMS - *Matrix-assisted laser desorption coupled imaging mass spectrometry*

MS - *Mass spectrometry*

NMR – *Nuclear magnetic resonance*

OKA - Okavango Delta

PAN - Pantanal

PS - *Paper spray*

Q – Quadrupolo

RF - Rádio frequência

RICO - *Ruthenium ion catalyzed oxidation*

SAME - *Software Assisted Molecular Elucidation*

SRFA - *Suwannee River Fulvic Acid Standard II*

TIMS - *Trapped ion mobility spectrometry*

TLC - *Thin-layer chromatography*

TOF – *Time-of-light*

TWIMS – *Traveling wave ion mobility spectrometry*

UNODC - *United nations office on drugs and crime*

UPLC - *Ultra Performance Liquid Chromatography*

Δ^8 -THC - Δ^8 -tetrahydrocannabinol

Δ^9 -THC - Δ^9 -tetrahydrocannabinol

RESUMO

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica que consiste na ionização de moléculas simples até estruturas complexas, realizando de forma eficiente e dinâmica com ampla aplicação devido a sua sensibilidade e velocidade de análise. Embora seja um tema que desperte bastante interesse perante a sociedade científica, a aplicação de novas tecnologias da MS no campo das análises de matrizes complexas ainda constitui uma linha de pesquisa pouco explorada.

Para análises de óleo bruto, parafina e padrões de aromáticos condensados, a *atmospheric solids analysis probe mass spectrometry* (ASAP-MS) é uma poderosa ferramenta na caracterização de amostras na sua forma original. Inicialmente, duas metodologias foram usadas para determinar a composição química das amostras: (1) usando gradiente de temperatura variando de 150 a 600 °C a uma taxa de aquecimento de 150 °C.min⁻¹ (Parafina) ou 50 °C.min⁻¹ (Óleo bruto); (2) com temperatura constante de aproximadamente de 350 °C. O ASAP(+)-MS ionizou o óleo bruto e a parafina, mostrando um perfil de petróleo típico na faixa de m/z 200 - 1400 para ambas amostras. Esse desempenho, principalmente relacionado à detecção de compostos de alto peso molecular (> 1000 Da), é superior ao de outras fontes de ionização tradicionais, como ESI, APCI, DART e DESI. Além disso, os padrões de AC foram identificados em ambas as formas: radicais, $[M]^{\bullet}$ e cátions protonados, $[M+H]^+$, com mínima fragmentação. Portanto, o ASAP foi eficiente por acessar a composição química de compostos polares e não polares.

Para análises da planta *Cannabis sativa* L. foi empregada a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a espectrometria de massas de mobilidade iônica por *traveling wave* (*ultra-high performance liquid chromatography coupled to traveling wave ionic mass spectrometry* - UPLC-TWIMS MS) usando a fonte de ionização por *electrospray* em ambos modos, ESI(±). Foram realizadas análises de haxixe, maconha e partes da planta *Cannabis sativa* L., flor e folha. A presença de uma mistura isomérica complexa dos canabinóides foram identificadas, principalmente Δ^9 -THC, canabidiol (CBN-C₅ e M_w = 310 Da), ácido Δ^9 -tetrahidrocanabinólico A e B (Δ^9 -THCA-C₅ A/B e M_w = 358 Da) e seus isômeros. Foram identificados três isômeros, m/z 315/313, 311, e 357 usando infusão direta por ESI-TWIMS MS, enquanto uma alta seletividade foi observada nos dados por UPLC-ESI-TOF MS, com separação isomérica de quatro a cinco compostos obtidos no modo único de aquisição de íons (SIM).

Em outro estudo, avaliamos o uso de um analisador de mobilidade de alta resolução com acoplado a espectrometria de massa de ultra-alta resolução para caracterização molecular de matéria orgânica dissolvida. Os objetivos incluem o estudo da reprodutibilidade da *trapped ion mobility spectrometry* (TIMS), faixa de aplicabilidade e possíveis desafios durante a análise de rotina. O TIMS acoplado ao TOF MS e FT-ICR MS apresentou desempenho semelhante e alta reprodutibilidade. Para a análise de misturas complexas, ambos analisadores foram capazes de capturar as principais características. No entanto, à medida que a complexidade química aumenta a nível da massa nominal ($m/z > 300-350$), apenas o TIMS-FT-ICR MS foi capaz de resolver as tendências composicionais de menor abundância.

Palavras-chave: espectrometria de massa; mobilidade iônica; canabinóides; petróleo; matéria orgânica.

ABSTRACT

Mass spectrometry (MS) is a technique able to ionize simple molecules until complex structures, performing efficiently and dynamically with a wide application using high sensitivity and speed of analysis. Although MS has considerable interest in the scientific society, the application of new technologies in the field of complex matrix analysis still is little explored.

In analyzes of crude oil, paraffin and condensed aromatic standards, the atmospheric solids analysis probe mass spectrometry (ASAP-MS) is a powerful ionization source for characterization of samples in original form. Initially, two methodologies were used to determine the chemical composition of the samples: (1) using a temperature gradient ranging from 150 to 600 °C at a heating rate of 150 °C.min⁻¹ (parafina) or 50 °C.min⁻¹; (2) with a constant temperature around 350 °C. ASAP(+)-MS ionized crude oil and paraffin, showing a typical petroleum profile in the range of m/z 200 - 1400 for both samples. This performance could relate ASAP source to detection of compounds of high molecular weight (> 1000 Da). In addition, the AC standards were identified in two ionic forms: radicals, $[M]^+$ and protonated cations, $[M+H]^+$, with minimal fragmentation. Therefore, ASAP was efficient for accessing the chemical composition of polar and non-polar compounds.

Analysis of the *Cannabis sativa* L. plant, were doing by ultra-high performance liquid chromatography coupled to traveling wave ionic mass spectrometry (UPLC-TWIMS MS) using electrospray ionization source in both modes, ESI (\pm). Hashish, marijuana, and parts of the plant *Cannabis sativa* L. (flower and leaf) were analyzed. Isomeric compounds were identified in a complex mixture of cannabinoids, mainly Δ^9 -THC, cannabidiol (CBN-C₅ and M_w = 310 Da), Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A and B (Δ^9 -THCA-C₅ A/B and M_w = 358 Da) and their isomers. Analizes by ESI-TWIMS MS were identified three isomers, m/z 315/313, 311, and 357, while a high selectivity was observed in UPLC-ESI-TOF MS data, identifying more than four isomeric compounds in the single ion acquisition mode (SIM).

In other study, we evaluated the use of a high resolution mobility analyzer coupled to ultra high resolution mass spectrometry for molecular characterization of dissolved organic matter. The main goal was to validate the reproducibility of trapped ion mobility spectrometry (TIMS), the range of applicability and possible challenges during routine analysis. TIMS coupled to TOF MS and FT-ICR MS showed similar

performance and high reproducibility. For the analysis of complex mixtures, both platforms were able to acquired the main characteristics. However, the increase of chemical complexity at nominal mass level ($m/z > 300 - 350$), only TIMS-FT-ICR MS was able to solve the compositional tendencies of lower abundance.

Keywords: mass spectrometry; ion mobility; cannabinoids; petroleum; organic matter.

SUMÁRIO

Capítulo 1: Introdução Geral.....	20
1.1 Métodos de Ionização.....	23
1.2 Analisadores de Massas.....	25
1.3 Espectrometria de Mobilidade Iônica.....	28
Capítulo 2: Aplicação da fonte de ionização por <i>Atmospheric Solids Analysis Probe</i> (ASAP) em Petrolômica.....	30
2.1 Introdução.....	30
2.2 Objetivos.....	33
2.3 Metodologia.....	33
2.4 Resultados e Discussão.....	34
2.5 Conclusão.....	40
Capítulo 3: Separação isomérica de Canabinóides por UPLC e Espectrometria de Mobilidade Iônica: <i>Traveling wave ion mobility mass spectrometry</i> (TWIMS-MS).....	41
3.1 Introdução.....	41
3.2 Objetivos.....	45
3.3 Metodologia.....	46
3.4 Resultados e Discussão.....	47
3.5 Conclusão.....	57
Capítulo 4: TIMS-TOF MS vs TIMS-FT-ICR MS: aplicação em matéria orgânica dissolvida.....	58
4.1 Introdução.....	58
4.2 Objetivos.....	58
4.3 Metodologia.....	59
4.4 Resultados e Discussão.....	62

4.5 Conclusão.....	77
Capítulo 5: Análise de Matéria Orgânica Dissolvida de zonas úmidas subtropicais usando espectrometria de mobilidade iônica (<i>Trapped Ion Mobility</i>) e FT-ICR MS.....	78
5.1 Introdução.....	78
5.2 Objetivos.....	79
5.3 Metodologia.....	79
5.4 Resultados e Discussão.....	81
5.5 Conclusão.....	99
6 Conclusão Geral.....	100
7 Referências.....	101
Anexos.....	108

CAPÍTULO 1.

INTRODUÇÃO GERAL

A espectrometria de massas (*mass spectrometry* – MS) é uma ferramenta analítica poderosa e amplamente aplicada nas áreas da petroleômica, proteômica e metabolômica (Takats *et al.*, 2011). De maneira geral, a técnica consiste na ionização de moléculas simples até estruturas complexas, realizando de forma eficiente a separação dos íons com base nas diferentes razões massa/carga, m/z (Silverstein, 2005).

A principal dificuldade, inicialmente, está no processo de transferência da molécula do analito para sua forma iônica, no qual moléculas alvo são normalmente encontradas em misturas complexas (Takats *et al.* 2011). Algumas técnicas de ionização são muito enérgicas podendo causar fragmentação. Dessa forma, é importante considerar a energia interna transferida durante o processo de ionização e as propriedades físico-químicas da substância analisada (Hoffman, 2000).

O desenvolvimento da MS deve-se, principalmente, as novas invenções aplicadas as fontes de ionização, cada vez mais abrangentes e poderosas, e aos avanços tecnológicos referente aos analisadores, capazes de diferenciar isômeros (Takats *et al.*, 2011). Recentemente, houve uma revolução nos mecanismos de ionização ambiente. Essa técnica permite gerar íons sob condições ambientes, muitas vezes sem preparo de amostra. Dentre as fontes de ionização ambiente destacam-se: DESI (*Desorption Electrospray*); DART (*Direct Analysis in Real Time*); ASAP (*Atmospheric Pressure Solid Analysis Probe*); PS (*Paper Spray*) (Alberici, 2010).

Na fonte de ionização por DESI, a amostra é colocada em uma superfície planar onde íons são produzidos a partir de gotículas de solventes carregadas de uma fonte tradicional de ESI (*electrospray*). Dessa forma, os analitos presentes na superfície são desorvidos e ionizados (Cooks e Ouyang, 2006).

A ionização por DART ocorre pela aplicação de um potencial elétrico a um gás com elevado potencial de ionização, tipicamente hélio, para formar um plasma de íons, e estes desorvem as moléculas a partir da superfície de uma amostra (Cooks e Ouyang, 2006).

Na ASAP, outra variação de fonte de ionização ambiente, são realizadas análises diretamente da amostra com auxílio de um capilar de vidro, o qual é submetido a um jato de gás aquecido em sua superfície. Dessa forma as espécies são desorvidas e ionizadas por uma descarga de corona em fase gasosa (Cooks e Ouyang, 2006).

A ionização por ASAP tem sido aplicada na caracterização sem necessidade do uso de solventes e nem preparo de amostras (Whu *et al.*, 2015). Uma das principais vantagens dessa técnica é a possibilidade de caracterização de matrizes complexas, como petróleo, utilizando um gradiente de temperatura que proporciona a vaporização gradual durante a ionização, obtendo-se caracterização de cada fração conforme sua temperatura de ebulição (Whu *et al.*, 2015).

O método de ionização por PS (*Paper Spray*) ocorre pela aplicação de uma voltagem a um papel de filtro triangular umedecido com uma pequena quantidade da solução do analito. A tensão necessária para promover a ionização é devido ao uso de uma solução condutora. Dessa forma, a solução flui para a extremidade triangular levando a ionização do analito (Shi *et al.*, 2015). Shi e colaboradores (2015) utilizaram a técnica de *Paper Spray* para monitorar o nível da droga *tracomilus* no sangue. A ionização gerou íons em fase gasosa diretamente da mancha de sangue seco, sem preparo da amostra.

DART também foi aplicado para a análise de fluidos corporais incluindo sangue, saliva e urina, sendo que nenhum preparo de amostra foi necessário. Em todos os casos, um capilar de vidro foi mergulhado no fluido e, posteriormente, submetido ao feixe ionizante da fonte DART. Alguns compostos endógenos como aminoácidos, uréia, ácido úrico, creatinina, assim como compostos exógenos, como medicamentos e cafeína foram detectados. Dessa forma, observou-se que a fonte DART pode fornecer uma seleção rápida e fácil do analito (Cody *et al.*, 2011). Kuki e colaboradores (2015) utilizaram DART MS para detecção de nicotina nas roupas de fumantes.

Outra técnica de destaque é a espectrometria de mobilidade iônica (*ion mobility spectrometry* - IMS), a qual trata-se de uma técnica de separação de íons em fase gasosa conforme sua carga, forma, tamanho e estrutura molecular (Paglia, 2015). A espectrometria de massas é responsável por medir a razão m/z dos íons, enquanto a espectrometria de mobilidade iônica adiciona uma nova dimensão dos dados, onde cada valor de m/z correspondente ao *drift time*. A separação ocorre numa escala de tempo de milissegundos, tornando-o adequado para o acoplamento com espectrometria de massa, sendo geralmente detectores por tempo-de-voo (Paglia, 2015).

Ahonen e colaboradores (2013), utilizaram a espectrometria de mobilidade iônica combinada com *traveling wave* (TWIMS) como um método rápido e reprodutivo para separação de isômeros de esteróides. Na pesquisa, três pares de isômeros de esteróides foram analisados em sua forma natural e seus derivados. Os isômeros dos

esteróides derivatizados foram adequadamente separados por TWIMS, com altos valores de resolução pico-a-pico.

Williams e colaboradores (2015) investigaram metabolitos indicativos de câncer no tecido epitelial do intestino usando a IMS. Através de análises em tecido animal, treze metabolitos foram especificados, dos quais o alto índice da proteína *HMGB1* sugere alterações metabólicas que contribuem para a patogênese. Estes metabolitos podem servir como biomarcadores ou alvos terapêuticos.

Fasciotti e colaboradores (2012), compararam a eficiência do *Synapt* TWIMS, avaliando a mobilidade iônica de quatro isômeros de dissacarídeos em sua forma sodiada: maltose, lactose, sacarose e celobiose. A utilização do gás CO₂ mostrou melhora significativa da resolução, em comparação ao N₂, para separação dos dissacarídeos em uma célula de mobilidade iônica do *Synapt* TWIMS G2.

Barrère e colaboradores (2014) utilizaram IMS acoplada a fonte ASAP para caracterização de misturas de polímeros, os quais foram incluídos polímeros biodegradáveis. Foi demonstrado que as separações de íons em fase gasosa por IMS utilizando a fonte ASAP, aumentou a sensibilidade para detecção de polímeros com diferentes polaridades.

Em 2018, Tose *et al.* realizaram o estudo de moléculas modelo e matrizes complexas pelo acoplamento do Espectrômetro de Mobilidade de Iônica (*Trapped Ion Mobility spectrometry* - TIMS) com analisadores de espectrometria de massa de alta resolução (TOF MS e FT-ICR MS). TIMS foi utilizado com objetivo de proporcionar maior separação em diferentes analisadores (FT-ICR e TOF). A pesquisa centrou-se na versatilidade e vantagem de um dispositivo TIMS, comparando o poder de resolução de diferentes analisadores: FT-ICR e TOF. Diante da ampla variedade de técnicas de ionização e detecção em espectrometria de massas, possibilita-se um novo caminho para realizar estudos mais complexos.

1.1 MÉTODOS DE IONIZAÇÃO

Ionização por *Electrospray* (ESI)

A geração de íons por *electrospray* (ESI) possibilitou a caracterização detalhada não apenas compostos voláteis e termicamente estáveis, mas também uma ampla variedade de compostos não-voláteis e termicamente lábeis, como polímeros, biomoléculas, sais orgânicos e inorgânicos, antes não detectáveis (Silverstein, 2005). Assim, através do método ESI, moléculas de baixo ou alto peso molecular, alta polaridade e complexidade estrutural são facilmente ionizadas e analisadas por MS.

A Figura 1.1 ilustra o esquema básico da fonte ESI, técnica de ionização a pressão atmosférica (API – *atmospheric pressure ionization*) desenvolvida por John Fenn, prêmio Nobel de 2002. Nesta técnica as espécies do analito são ionizadas em solução e transferidas para fase gasosa, geralmente na forma de moléculas protonadas ou cátions (modo positivo), ou ainda moléculas desprotonadas ou ânions (modo negativo) (Vaz, 2013).

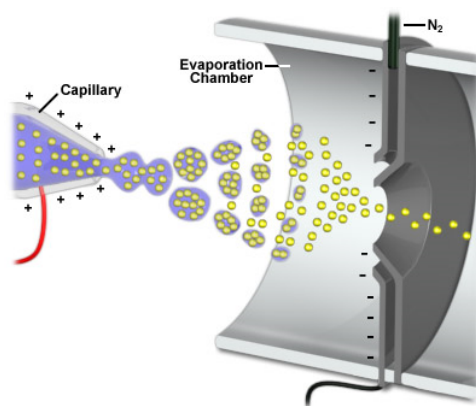


Figura 1.1 Esquema da fonte de ESI.

O processo de ionização por ESI à pressão atmosférica (API), ocorre pela aplicação de um campo elétrico forte a solução, do analito de interesse, que passa pelo capilar em fluxo contínuo baixo ($1-10 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$). O campo elétrico é resultante da diferença de potencial aplicada (1-4 kv) entre o capilar contra eletrodo a uma distância de 0,3 – 2 cm. Dessa forma, ocorre um acúmulo de cargas na superfície do líquido ao final do capilar, onde gotas altamente carregadas serão formadas. Um gás, geralmente nitrogênio, é injetado juntamente a solução, permitindo a dispersão das gotas carregadas e a formação do *spray*, em um espaço limitado. Essas gotas passam por um capilar aquecido para remover as últimas moléculas de solvente (Pereira, 2013).

Ao evaporar o solvente, o volume das gotas é reduzido provocando um aumento na repulsão entre os íons de mesma carga. Como resultado formam-se gotas contendo apenas um íon ou vários íons em fase gasosa (Kearle, 2000). A fonte de ESI é a única capaz de produzir moléculas monocarregadas e íons multicarregados a partir de macromoléculas. Esse fenômeno é observado, principalmente, em peptídeos e proteínas que possuem vários sítios de protonação ou desprotonação (Silverstein, 2005).

O avanço das técnicas de ionização ambiente, proporcionados pela ESI, simplificaram as análises de MS, possibilitando a ionização de uma grande variedade de compostos. No entanto, essas técnicas necessitam de procedimento de preparo de amostras, como: I) extração das moléculas dos seus ambientes naturais ou matrizes; II) preparo de soluções em solventes ultra-puros; III) etapas de pré-separação. Isso pode ocasionar interferências químicas, contaminação do analito, distribuição homogênea da matriz na solução e maior tempo para obtenção dos resultados (Silverstein, 2005).

DESI e DART foram as primeiras fontes de ionização ambiente desenvolvidas para análises em MS. Posteriormente, outras foram desenvolvidas seguindo os mesmos princípios, sendo as mais típicas ASAP e PSI (Takats, 2006).

Essas técnicas de ionização ambiente apresentam como principal vantagem o vasto campo de aplicação, sendo possível analisar drogas de abuso, produtos farmacêuticos, proteínas, lipídeos, petróleo e seus derivados, além da construção de imagens químicas a partir de matrizes biológicas.

Atmospheric Pressure Solids Analysis Probe (ASAP)

A ionização por ASAP, desenvolvida por McEwen, tem sido aplicada na caracterização compostos orgânicos voláteis ou semivoláteis em amostras líquidas ou sólidas. A fonte de ionização utiliza um fluxo N_2 à quente (até 600°C) para impactar a superfície da amostra, depositada em um tubo capilar de vidro. Os analitos resultantes são transferidas pelo N_2 , por dessorção térmica, até a ponta da agulha que é responsável pela ionização através da descarga corona. Essa técnica permite que vários compostos sejam detectados, analisando desde matrizes complexas, como amostras de tecido biológico/fluidos, até esteróides, polímeros, drogas e partículas em suspensão (Huang, 2011).

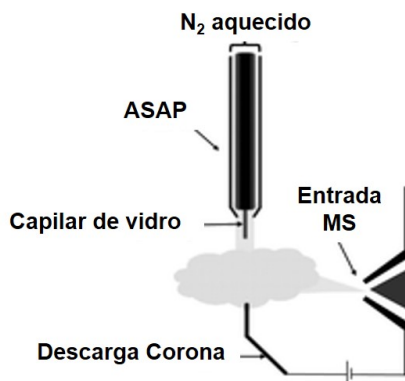


Figura 1.2 Esquema da fonte de ASAP.

Fonte: Whu, 2015.

O ASAP destaca-se entre as fontes de ionização devido a facilidade de análise, visto que as amostras são aplicadas em um capilar de vidro sob controle de aquecimento, sem qualquer preparo da amostra. Lv *et al.* analisaram amostras de carvão mineral por GC-MS (*Gas chromatography coupled mass spectrometry*) e ASAP-TOF MS, onde constataram a presença de alcanos, arenos e compostos orgânicos (Lv, 2014). Whu *et al.* realizaram experimentos com padrões de parafinas, isoparafinas, naftenatos e hidrocarbonetos aromáticos por ASAP MS (Whu, 2014).

1.2 ANALISADORES DE MASSAS

Quadrupolares (Q)

Os analisadores quadrupolares, Q, são confeccionados de quatro cilindros metálicos que são posicionados paralelamente. O analisador quadrupolar consiste na aplicação de uma corrente elétrica contínua e um potencial de rádio frequência (RF) nos quatro cilindros metálicos paralelos. Os íons que apresentarem uma trajetória estável no campo elétrico quadrupolar resultante alcançarão em direção ao detector. Para isso é necessário que os íons produzidos na fonte de ionização sejam focalizados na região central na entrada do quadrupolo. Suas trajetórias serão dependentes do campo elétrico resultante, onde apenas os íons de uma razão m/z específica terão uma trajetória estável e chegarão ao detector (Pereira, 2013).

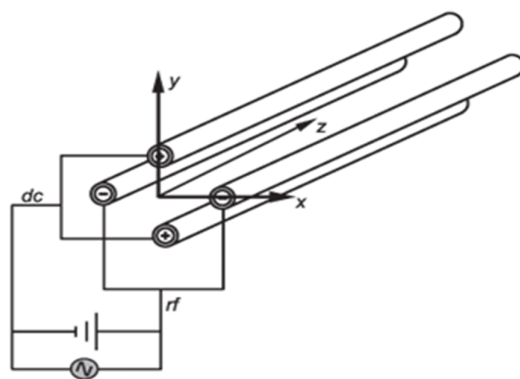


Figura 1.3 Analisador Quadrupolo (Q)

Fonte: Silverstein, 2005.

A principal vantagem desses analisadores é o baixo custo, fácil operação e manutenção, possibilidade de realizar experimentos de MS/MS, sendo eficaz para rotinas de laboratório. Uma desvantagem desse analisador é a baixa resolução.

Tempo de Voo (TOF)

O analisador por Tempo de voo (*time-of-flight* - TOF) possui como principal diferencial a facilidade de operação, onde o princípio de separação é baseado na cinética dos íons. Inicialmente, os íons entram no TOF e recebem um pulso de energia igual. Em seguida, eles entram em uma região livre de potencial (tubo do TOF) e são separados pela razão m/z . Desse modo, íons com diferentes m/z possuem velocidades diferentes e, portanto, chegam ao detector em tempos diferentes. Os íons mais leves chegam mais rápido ao detector do que os mais pesados (Silverstein, 2007).

Esses analisadores podem operar em dois modos: linear ou reflectron. O modo linear é utilizado para moléculas de massa molar elevada, como proteínas, peptídeos e polímeros. O modo *reflectron* é utilizado para moléculas de baixa massa molar. As principais vantagens dos instrumentos TOF são a faixa m/z de um analisador TOF é ilimitada; os analisadores TOF oferecem alta transmissão de íons e, portanto, contribuem para sensibilidade; o design e a construção do instrumento TOF é relativamente simples; instrumentos TOF modernos permitem medições com alta precisão (Michelmann, 2013).

Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de *Fourier*

Pela técnica de FT-ICR MS, os íons são mantidos em uma célula sob um potencial elétrico de captura e um campo magnético intenso. No interior da célula, cada íon orbita em uma direção perpendicular à do campo magnético, com uma frequência proporcional à razão m/z do íon (Silverstein, 2007). É considerada uma técnica analítica versátil devido ao altíssimo poder de resolução e exatidão em massas, que permite determinar a composição molecular de matrizes complexas. Além disso, apresenta capacidade de análises do tipo MS/MS, importante para determinação de estrutura molecular (Klitzke, 2012).

Em geral, a aplicação de uma metodologia para a técnica de FT-ICR MS não é um procedimento simples, passando pelo processo de ionização (fonte de ionização, voltagem no capilar e fluxo de gás), transmissão do íon (controle da quantidade e da distribuição desses íons dentro da cela de ICR, *ion accumulation time* (ICT), e *time-of-flight* (TOF), eliminação de clusters: *skimmer* e *collision voltage*) até o analisador (voltagens no *trap* de excitação, *sweep excitation power*, e detecção, *front and blackplate*; cinética dos íons, *sidekick* e *sidekick offset*; tempo de aquisição e resolução do sinal).

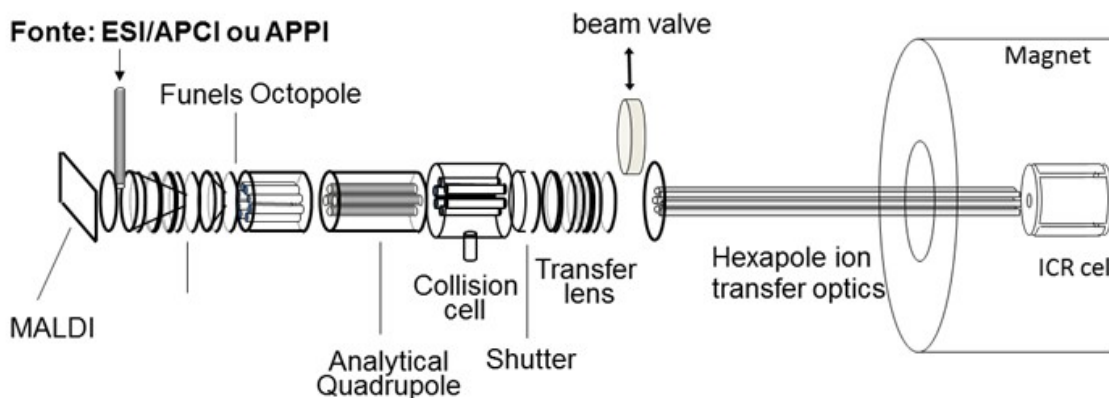


Figura 1.4 Esquema do FT-ICR MS

Fonte: Pereira, 2013.

A altíssima resolução do método permite a atribuição da composição elementar dos milhares de compostos encontrados em amostras complexas, como petróleo, o que possibilita agrupar os compostos em classes (classificação em relação ao número de N, S e O), *tipo* (número de anéis mais duplas ligações) e o grau de alquilação (ou seja, o número de unidades $-CH_2$ para compostos de uma determinada classe e tipo) (Vaz, 2011).

1.3 ESPECTROMETRIA DE MOBILIDADE IÔNICA

A MS é reconhecida como uma das técnicas instrumentais mais úteis e poderosas na investigação científica com ampla aplicação em diversas áreas da ciência, como perfil químico e geológico do petróleo e seus marcadores, produtos naturais, sequenciamento de peptídeos e proteínas, estudo de mecanismos orgânicos, identificação de biomarcadores em meios orgânicos complexos, síntese de compostos orgânicos (Kill, 2016). Contudo, o estudo de compostos orgânicos proveniente de recursos naturais torna-se um procedimento complexo e desafiador, exigindo técnicas analíticas avançadas capazes de resolver milhares de compostos em um processo de escala molecular (Antony, 2017).

Devido à enorme complexidade de diversas matrizes orgânicas, a espectrometria de massa de alta resolução (por exemplo, TOF MS – *Time-of-flight mass spectrometry*; FT-ICR MS – *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*) destaca-se pela capacidade de identificação a nível molecular usando medidas de massa exatas (Pereira, 2014). Em relação a alta resolução e precisão, o FT-ICR MS destaca-se nas análises de misturas complexas. A altíssima resolução proporcionada pela técnica, permite a separação e detecção de milhares de íons produzidos por compostos específicos e fornece informações precisas, como a fórmula elementar (C_xH_yN_zO_w), a ligação dupla equivalente (DBE), o perfil de isotopólogos e a conectividade química (a partir de experimentos de dissociação induzida por colisão (CID - *collision induced dissociation*) (Oliveira, 2016).

Nesse contexto, a espectrometria de massa associada a mobilidade iônica (IMS - MS) surge como uma ferramenta analítica inovadora para identificação de compostos isoméricos (Fernandez-Lima, 2011). Desenvolvida no final dos anos 70, o IMS permite a separação dos íons pela razão tamanho-carga (Ω/z) na presença de um gás neutro. Inicialmente conhecida como cromatografia de plasma ou cromatografia iônica, o IMS foi acoplado à espectrometria de massa (MS) para obter separações rápidas e complementares. Em geral, o IMS-MS oferece várias vantagens sobre MS tradicional, incluindo a separação de íons de misturas com base na composição e estado de carga, a capacidade de separar isômeros geométricos e aumentar a faixa de aquisição de dados (Hernandez, 2014).

A IMS fornece a separação dos íons da fase gasosa de acordo com sua relação massa/carga (m/z) e forma. A separação ocorre em uma escala de tempo de

milissegundos, tornando-o adequado para o acoplamento com espectrometria de massa (MS), em que a detecção com instrumentos de *time-of-flight* (TOF) geralmente são empregados (Ahonen, 2013). Além disso, a separação de íons com base nas diferenças em sua mobilidade na fase gasosa em termos de *collision cross-section* (Benigni, 2016). Nitrogênio e hélio são os principais gases de mais usados como *drift gas*, mas alguns estudos mostram que moléculas mais polarizáveis, como o CO₂, podem melhorar a resolução do IMS.

Uma cela IMS consiste em três seções principais: funil de entrada, seção do analisador e funil de saída. Em geral, os íons são tipicamente gerados usando uma fonte de ionização e introduzidos no dispositivo IMS através de um capilar de vidro para transferência de íons. Uma cela de mobilidade é construída a partir de um conjunto de eletrodos de anéis segmentados (Hernandez, 2014). A separação é obtida quando um íon é acelerado por um campo elétrico e sofre colisões com um gás, sendo distinguido com base na *collision cross section* (CCS) do íon, que depende da estrutura e do gás de arraste (Benigni, 2017). A definição da CCS é crucial na elucidação estrutural de biomoléculas, tais como proteínas e complexos proteicos, DNA, drogas e hormônios.

Em especial, o IMS-MS possui vantagens para a biologia estrutural. A técnica permite solucionar questões fundamentais, incluindo o dobramento de proteínas, especialmente para proteínas intrinsecamente desordenadas, mas também em aplicações de pequenas moléculas, como no estudo de produtos farmacêuticos, metabólitos e pesticidas (Benigni, 2017).

Com o advento de formas mais versáteis e de alta resolução na espectrometria de mobilidade iônica (IMS – *ion mobility spectrometry*) (por exemplo, TWIMS - *traveling wave ion mobility spectrometry*; TIMS - *trapped ion mobility spectrometry*), surge a possibilidade de identificar moléculas de interesse em amostras complexas, como no petróleo bruto, porfirinas metálicas e emulsão de petróleo, conseguido aumentar a intensidade do pico e a faixa dinâmica de alcance (Hernandez, 2014; Schenk, 2014).

Estudos anteriores ilustram as vantagens do IMS-MS pela capacidade de separar íons ao longo de linhas de tendência conforme sua mobilidade, separando os compostos em classes químicas. Além disso, o IMS-MS é capaz de realizar análises de misturas complexas no campo da proteômica, metabolômica e petroleômica.

Capítulo 2: Aplicação da fonte de ionização por *Atmospheric Solids Analysis Probe* (ASAP) em Petroleômica

2.1 INTRODUÇÃO

O petróleo é considerado uma mistura de alta complexidade existente na natureza, sendo um grande desafio a caracterização do perfil químico dos seus constituintes (Vaz, 2012; Marshall, 2004). A petroleômica surge como ciência destinada ao estudo do petróleo, possibilitando a caracterização de compostos orgânicos do óleo bruto, frações e seus subprodutos a nível molecular, correlacionando suas propriedades ao seu comportamento desde a extração até o refino (Vaz, 2012). Dessa forma, a petroleômica é a ciência que visa correlacionar a composição molecular do óleo bruto, frações ou cortes de petróleo com as características físicas e químicas. Entre as técnicas aplicadas na caracterização está a espectrometria de massas de alta resolução, utilizada para determinar a funcionalidade e estrutura bruta de moléculas presentes numa mistura complexa (Pereira, 2014).

A espectrometria de massas por ionização ambiente é um método rápido e simples para transferir os analitos diretamente para forma iônica e, além disso, trata-se de técnicas de baixo custo e realizadas a pressão ambiente. A evolução e o crescimento das técnicas de ionização ambiental são refletidos pelo explosivo aumento no número de aplicações que incluem ciências "OMICAS", variando de proteômica e metabolômica, bem como petroleômica.

Corilo *et al.* utilizaram *easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry*, EASI(\pm), para análise de amostras de óleo bruto. EASI mostrou-se capaz de dessorver e ionizar um grande número de componentes polares, a partir de uma única gota de amostra colocada sobre uma superfície inerte. A fonte possibilitou a formação simultânea de íons $[M+H]^+$ e $[M-H]^-$, analisados por espectrometria de massas por ressonância ciclotrônica de íons e transformada de Fourier (FT-ICR MS), com atribuição de mais 6000 compostos ácidos e básicos. Deve-se ressaltar que a fonte EASI é uma técnica de ionização livre de tensão, o que reduz problemas de fragmentação (Corilo, 2010).

Em 2012, Benassi *et al.* usaram a *atmospheric pressure low-temperature plasma* (LTP) para dessorção e ionização de compostos presentes no petróleo bruto, assim como em padrões de óleo combustível residual. A LTP mostrou rapidez para análise de

moléculas de baixo peso molecular, possibilitando a caracterização e diferenciação entre amostras de óleo bruto (Benassi *et al.*, 2012).

Segundo Marshall e Rodgers, a ionização de hidrocarbonetos saturados é especialmente problemática, visto que grande parte dos métodos ocasionam fragmentação, tornando-se difícil a identificação dos precursores neutros na amostra original (Marshall e Rodgers, 2008).

Em 2004, Campbell *et al.* ionizaram hidrocarbonetos saturados por *laser-induced acoustic desorption* (LIAD) combinado a ionização química usando o cátion ciclopentadienil cobalto (CpCO^{+}). Os alcanos $\text{C}_{24}\text{H}_{50}$ e $\text{C}_{50}\text{H}_{102}$ foram identificados na forma iônica do composto $[\text{R}+\text{CPCO}-2\text{H}_2]^{+}$, onde R corresponde a cada alcano (Campbell *et al.*, 2004).

Em 2012, Zhou *et al.* desenvolveram uma nova técnica para a caracterização de hidrocarbonetos, onde alcanos lineares foram seletivamente oxidados para cetonas por oxidação catalisada por íon rutênio (RICO - *ruthenium ion catalyzed oxidation*). De maneira análoga, os alcanos ramificados e cíclicos foram oxidados a álcoois e cetonas. As cetonas foram então reduzidas a álcoois por hidreto de alumínio e lítio (LiAlH_4). Os monoálcoois foram caracterizados por ESI-FT-ICR MS no modo negativo de ionização para identificação de iso-parafinas, parafinas acíclicos e parafinas cíclicas (Zhou *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2014).

Gao *et al.* empregaram a técnica por *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI) para ionização de hidrocarbonetos saturados e insaturados, lineares, ramificados, cíclicos, assim como os poliaromáticos e os heteroatômicos. Para ionização, utilizou-se um solvente alifático de cadeia curta com a finalidade de melhorar o mecanismo de ionização. O método por APCI mostrou-se eficaz gerando diferentes tipos de íons ($[\text{M}+\text{H}]^{+}$; $[\text{M}]^{+}$; $[\text{M}-\text{H}]^{+}$; $[\text{M}-2\text{H}]^{+}$), com pouca ou nenhuma fragmentação (Gao *et al.*, 2012).

Nyadong *et al.* utilizaram uma nova metodologia usando O_2 como gás transportador e reagente na ionização por *atmospheric pressure laser-induced acoustic desorption chemical ionization* (AP/LIAD-CI). A metodologia surge como uma nova abordagem para análise de misturas de hidrocarbonetos saturados (Nyadong *et al.*, 2012).

Tose *et al.* desenvolveram um método de ionização de hidrocarbonetos por APCI(+)-FT-ICR MS usando como solvente hidrocarbonetos de cadeia curta,

destacando-se o isooctano. O método de ionização gerou íons $[M-H]^+$ sem fragmentação, usando o nitrogênio como gás (Tose *et al.*, 2015).

Romão *et al.* analisaram amostras de óleo bruto, parafinas e compostos padrões de porfirinas por *direct analysis in real time* (DART) no modo positivo de ionização. Nas análises do óleo bruto, por DART(+)-Orbitrap, foi identificado as típicas classes de compostos N, NO e O. Nas amostras de parafinas, foram detectados hidrocarbonetos oxigenados, onde as estruturas e conectividade foram confirmadas por experimentos de dissociação induzida por colisão (*Collision induced dissociation* - CID). As porfirinas formaram íons $[M+H]^+$, onde $M = C_{44}H_{30}N_4$ e $C_{44}H_{28}N_4OV$, foram as fórmulas atribuídas com base nos experimentos de CID (Romão *et al.*, 2016).

O *Atmospheric Solids Analysis Probe Mass Spectrometry* (ASAP) destaca-se entre as fontes de ionização devido a facilidade de análise. Nesta fonte, as amostras são aplicadas em um capilar de vidro sob um controle de aquecimento, sem qualquer preparo da amostra. Contudo, a principal vantagem do ASAP é a caracterização do petróleo por aplicação de uma rampa de temperatura, simulando o fracionamento da amostra. Dessa forma, são gerados espectros com maior amplitude do intervalo dinâmico da análise (Lv *et al.*, 2014).

Whu *et al.* realizaram experimentos com padrões de parafinas, isoparafinas, naftenatos e hidrocarbonetos aromáticos por ASAP-MS. As parafinas cíclicas e compostos aromáticos foram ionizados principalmente por transferência de carga. Também foi analisada a fração saturada do petróleo, onde se observou maior abrangência de compostos, m/z 400 a 1600 (Whu *et al.*, 2015).

Compostos modelos de pireno, antraceno e fenantreno foram analisados por Wang *et al.* por ASAP-TOF MS. A fonte ASAP gerou principalmente íons na forma cátions radicalares, $[M^+]$, e também houve formação de fragmentos por clivagem ou rearranjo. A identificação desses compostos possibilitou a aplicação da metodologia em subprodutos da extração do carvão mineral (Wang *et al.*, 2014).

Neste estudo, ASAP-MS no modo positivo de aquisição, ASAP(+)-MS, acoplada ao Synapt G2S-MS foi otimizada para análises de cinco padrões de aromáticos condensados (AC) (benz[a]antraceno; coroneno; Mistura de hidrocarbonetos poliaromáticos; 2,9dipropilant[2,1,9def:6,5,10d'e'f']diisoquinolina1,3,8,10(2H,9H) tetrona; e N,N'bis(3-pentil)perileno-3,4,9,10-bis(dicarboximida)), assim como análises para um óleo bruto e uma fração parafínica. Duas formas de aquisição foram avaliadas: 1) usando gradiente de temperatura com capilar de vidro na sonda do ASAP (150 a 600

°C com uma taxa de aquecimento de 150 °C/min (parafina) ou 50 °C/min (óleo bruto); 2) procedimento isotérmico (~350 °C).

2.2 OBJETIVOS

Aplicar a fonte de ionização ambiente ASAP para análises de fração parafínica, óleo bruto e padrões de hidrocarbonetos aromáticos, com rapidez, praticidade e mínimo preparo de amostra.

2.3 METODOLOGIA

Metanol, Trifluoracetato de sódio (NaTFA), L-arginina, e ácido fórmico (HCOOH) grau de pureza analítico > 99,99%, Sigma–Aldrich Chemicals, USA, usados para calibração do FT-ICR MS. Formeato de sódio e Leu-enk, também de grau de pureza analítica > 99,99% (Sigma-Aldrich Chemicals, USA), que foram usados para calibração do Synapt G2-S HDMS.

Um óleo bruto (CENPES/Petrobras, Brasil), cinco padrões hidrocarbonetos poliaromáticos (Sigma Aldrich, USA), e uma amostra de hidrocarboneto saturado (parafina) foram estudados neste trabalho. Os padrões de aromáticos condensados (AC) foram: (1) benz[a]antraceno; (2) coroneno; (3) Mistura de hidrocarbonetos poliaromáticos; (4) 2,9-dipropilant[2,1,9def:6,5,10d'e'f'] diisoquinolina 1,3,8,10(2H,9H) tetrona; e (5) N,N'-bis(3-pentil)perileno-3,4,9,10-bis(dicarboximida).

ASAP(+)MS

As análises ASAP(+)MS foram realizadas no Synapt G2HDMS (*Waters Corporation*), Figura 2.1. Os padrões de hidrocarbonetos poliaromáticos (1 - 5), óleo bruto e uma parafina foram analisados no modo positivo de ionização. O Synapt G2HDMS é um espectrômetro de massas com analisadores híbridos quadrupolar e tempo de voo (*time-of-flight*). Aproximadamente, 1 mg da amostra foi depositada diretamente em um capilar de vidro e inserido na fonte ASAP, Figura 2.1. As condições de operação foram: temperatura aplicada na sonda variou de 150 a 600 °C ou temperatura constante a 350 °C; voltagem no capilar: 3000 V; descarga corona de 9000 nA; temperatura do gás de secagem a 150 °C; e uma faixa dinâmica de aquisição de íons de m/z 200–1500. O poder de resolução ($m/\Delta m_{50\%}$) de 38 000 a 47 000, onde $\Delta m_{50\%}$ é a largura do pico a meia altura. Todos espectros de massas foram adquiridos e processados usando o *software* MassLynx 4.1 (*Waters Corporation*).

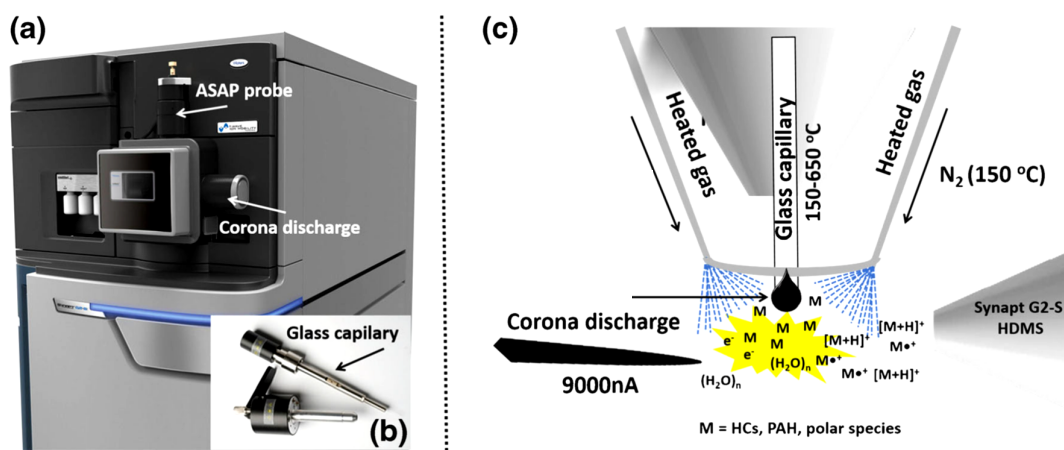


Figura 2.1 Imagens para a) Sistema ASAP(+)-MS; b) Sonda para fonte de ionização ASAP; c) Mecanismos de ionização por protonação ($[M+H]^+$) e transferência de elétrons ($[M]^{•+}$).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises dos Padrões AC

A fonte ASAP(+) ionizou facilmente os padrões de AC, dos quais foram obtidos os espectros de massas para os cinco padrões comerciais utilizando um gradiente de temperatura de 100 a 350 °C com uma variação de 50 °C min⁻¹. Em geral, os padrões de AC foram ionizados por transferência de elétrons ($M^{•+}$) seguido por protonação ($[M+H]^+$). Os valores de massa experimental, DBE (*double bond equivalent*) e o erro de massas estão na tabela 2.1. Conforme o mecanismo de ionização da fonte ASAP(+), foram formados dois tipos de íons ($M^{•+}$ e $[M+H]^+$), o que resultou na detecção de nove sinais com DBE de 13 a 21 e erro próximo de 5 ppm.

O mecanismo de ionização por ASAP ocorre analogamente ao APCI, em que os compostos são volatilizados por uma corrente de gás nitrogênio aquecido, e submetido a reação de transferência de protons devido a descarga corona, onde os protons, elétrons e radicais são formados e, posteriormente, os íons $[M+H]^+$ e $M^{•+}$ são gerados (Figura 2.1c). A principal peculiaridade dessa fonte é a sua capacidade de ionizar compostos polares e apolares simultaneamente (Fussel, 2010). Além disso, a fonte ASAP(+) mostrou-se capaz de ionizar os padrões AC com mínima fragmentação ou preparo de amostras.

É importante ressaltar que o padrão 3 foi suscetível a fragmentação, gerando os íons m/z 226 e 202, Figura 2.2. Contudo, esse fenômeno foi mais pronunciado para os padrões 4 e 5, onde diversos sinais são observados na região de m/z 110-390, no qual o íon m/z 390 é o fragmento de maior abundância. A alta suscetibilidade a fragmentação dessas duas moléculas está relacionado a presença do grupo carboxiamida. O fragmento m/z 390 é observado para os padrões 4 e 5 (transições $531 \rightarrow 390$ Da e $474 \rightarrow 390$ Da), que são produzidos pela clivagem da cadeia lateral do grupo carboxiamida com perdas neutras de $C_7H_{11}NO_2$ e C_4H_6NO (141 e 84 Da, respectivamente).

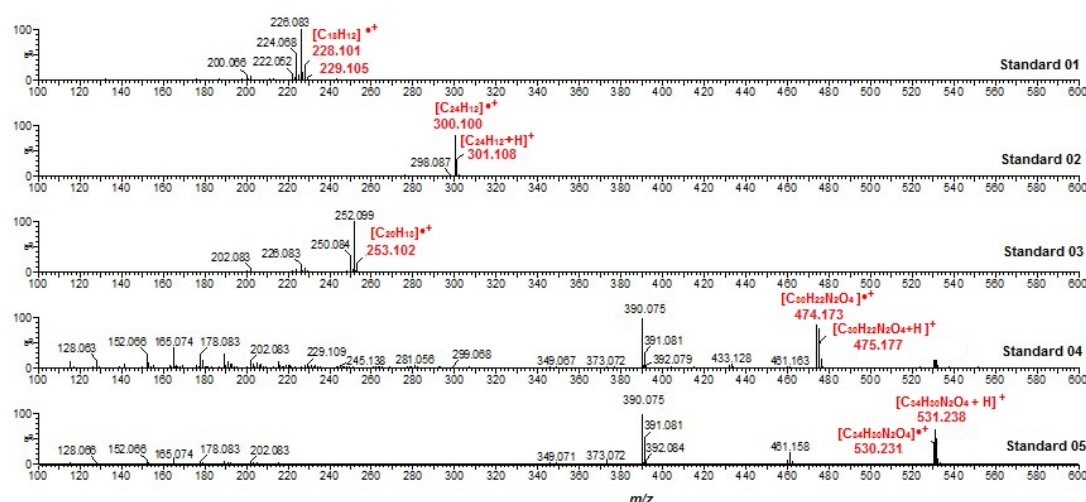
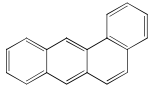

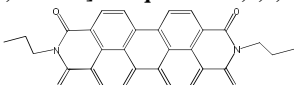
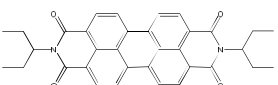


Figura 2.2 Compostos padrões de AC analisados por ASAP(+) MS.

Tabela 2.1 Padrões AC analisados por ASAP(+) MS.

Padrão	Experimental <i>m/z</i>	Erro (ppm)	[M+H] ⁺ M ⁺	DBE
1) Benz[a]antraceno	228.101	-3.51	[C ₁₈ H ₁₂] ^{•+}	13
	229.105	-1.75	[C ₁₈ H ₁₂ + H] ⁺	
2) Coroneno	300.100	-2.33	[C ₂₄ H ₁₂] ^{•+}	19
	301.108	1.99	[C ₂₄ H ₁₂ + H] ⁺	
3) Mistura de hidrocarbonetos poliaromáticos	253.102	3.95	[C ₂₀ H ₁₃] ^{•+}	15
4) 2,9 Dipropilanttra[2,1,9-def:6,5,10d'e'f']diisoquinolina1,3,8,10(2H,9H)tetrona	474.173	3.37	[C ₃₀ H ₂₂ N ₂ O ₄] ^{•+}	21
	475.177	2.53	[C ₃₀ H ₂₂ N ₂ O ₄ + H] ⁺	
6) N,N'-Bis(3-pentil)perileno-3,4,9,10-bis(dicarboximida)	530.231	2.08	[C ₃₄ H ₃₀ N ₂ O ₄] ^{•+}	21
	531.238	1.88	[C ₃₄ H ₃₀ N ₂ O ₄ + H] ⁺	

Analises de Óleo Bruto

Um típico óleo bruto brasileiro foi também analisado por ASAP(+) MS, Figura 2.3a-l, em função da temperatura de aquecimento do capilar da fonte (150 a 600 °C). Devido ao gradiente de temperatura, foi possível obter uma composição mais abrangente da amostra, onde a fonte ASAP(+) permitiu a separação de moléculas conforme seu ponto de ebulição, volatilizando e ionizando cada conjunto de compostos a uma temperatura específica, fornecida por uma taxa de aquecimento de 50 °C min⁻¹. Em todos os casos, uma típica distribuição do óleo bruto é claramente observada, onde o *m/z* 250-400 a 150-200 °C e *m/z* 1000-1300 a 600-650 °C. Em geral, o poder de resolução do espectro de massas foi por volta de $m/\Delta m_{50\%} = 39.000$ para *m/z* 894 e 47.000 para *m/z* 478.

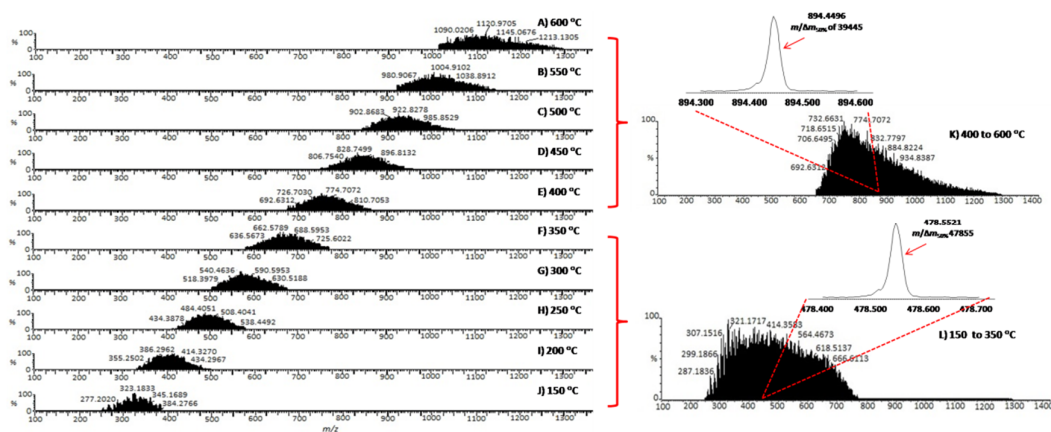


Figura 2.3 Espectros por ASAP(+) MS para o óleo bruto em diferentes temperaturas (a-j) e as regiões resultantes da integração entre as temperaturas: k) 400 a 600 °C; L) 150 a 300 °C.

Em 2014, Dalmaschio *et al.* investigou a composição química de 12 cortes obtidos a partir de um óleo bruto brasileiro ($\text{TAN} = 3,19 \text{ mg KOH g}^{-1}$). Os pontos de ebulição variaram de 100,4 a 372,9 °C, onde as classes de compostos contendo enxofre, nitrogênio e oxigênio (naftênicos, classe O_2 ; fenóis, classe O_1 ; sulfetos, classe S_1 ; piridinas, classe N) foram identificadas com intervalo m/z de 150 a 450 e números de carbono de C_8 a C_{25} . A distribuição de massa molecular média, M_w , deslocou-se para valores mais altos de m/z ($M_w = 169$ a 321 Da) em função da temperatura de corte da destilação. Correlacionando os dados obtidos por Dalmaschio *et al.* àqueles relatados na Figura 2.3, observamos que apenas a primeira faixa m/z de ASAP(+) MS, $T = 150\text{-}200$ °C, Figura 2.3i, corresponde a um perfil típico de corte de petróleo, como obtido a 305,9 - 372,9 °C. Espécies com número de carbonos menor que C_{20} ($m/z < 250$), não foram identificadas por ASAP MS através de experimentos por aplicação de gradiente de temperatura. Por outro lado, este problema pode ser contornado usando o modo de aquecimento isotérmico na fonte ASAP.

O espectro de massa por ASAP(+) foi obtido para o óleo bruto a uma temperatura constante de 400 °C, Figura 2.4. Os compostos moleculares detectados no óleo bruto variaram de m/z 200 a 900, indicando os compostos de menor peso molecular ($\text{C}_{20}\text{-C}_{60}$) que foram facilmente detectados usando um procedimento isotérmico. Por outro lado, um procedimento utilizando gradiente de temperatura, Figura 2.3, favoreceu o acesso, simultaneamente, à composição química de compostos de baixo e alto peso molecular ($\text{C}_{20}\text{-C}_{100}$). Os compostos de alto peso molecular são detectados

exclusivamente na Figura 2.3a-e, e correspondem às frações pesadas de petróleo bruto, como resinas e asfaltenos, bem como compostos nitrogenados básicos que estão tipicamente presentes em resíduos de vácuo.

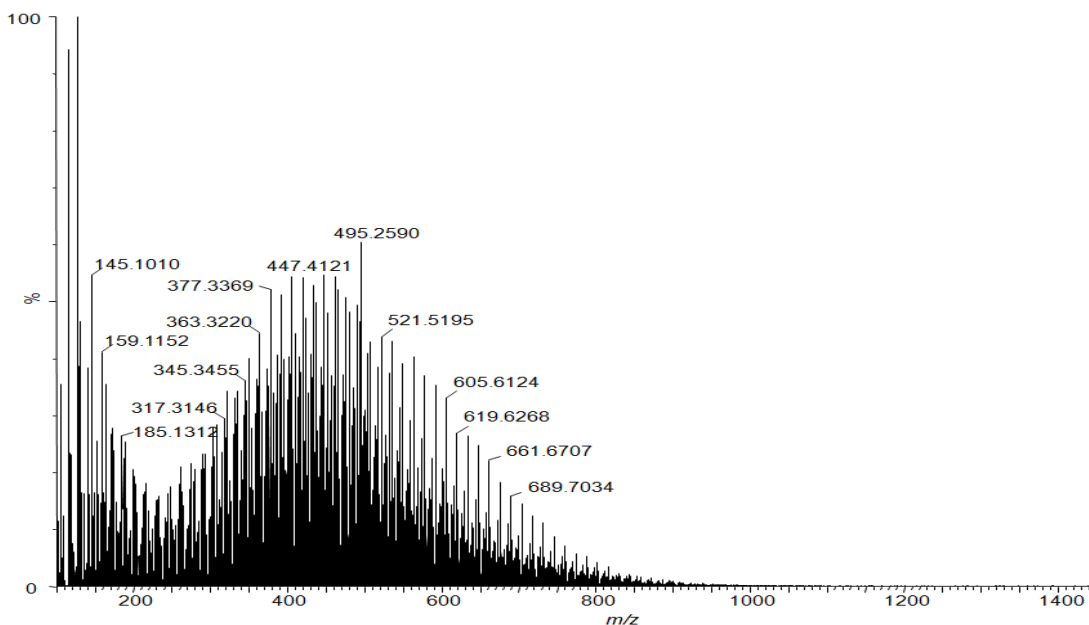


Figura 2.4 ASAP(+)-MS para óleo bruto adquirido por aquecimento isotérmico a 400 °C.

Analises de Parafina

A figura 2.5a-d mostra o espectro de massa ASAP(+) para a amostra de parafina quando aplicado o gradiente de aquecimento a fonte ASAP (150-600 °C). A parafina mostrou uma distribuição de m/z variando de 200 a 1400. Em geral, o poder de resolução dos espectros foi em torno de $m/\Delta m_{50\%} \approx 37.000$ a m/z 1028. O espectro de massa ASAP(+) para parafina no intervalo de temperatura de 600 a 400 °C, Figura 2.5a-b, permite a identificação seletiva de compostos de HCs de alto peso molecular contendo m/z 800 a 1300, enquanto a Figura 2.5c-d mostra a distribuição de compostos de HCs de baixa massa molecular com m/z 200 – 700 a 150 – 300 °C. Ao integrar todos os espectros ASAP(+), nota-se um perfil químico bimodal na faixa m/z de 200 a 1300.

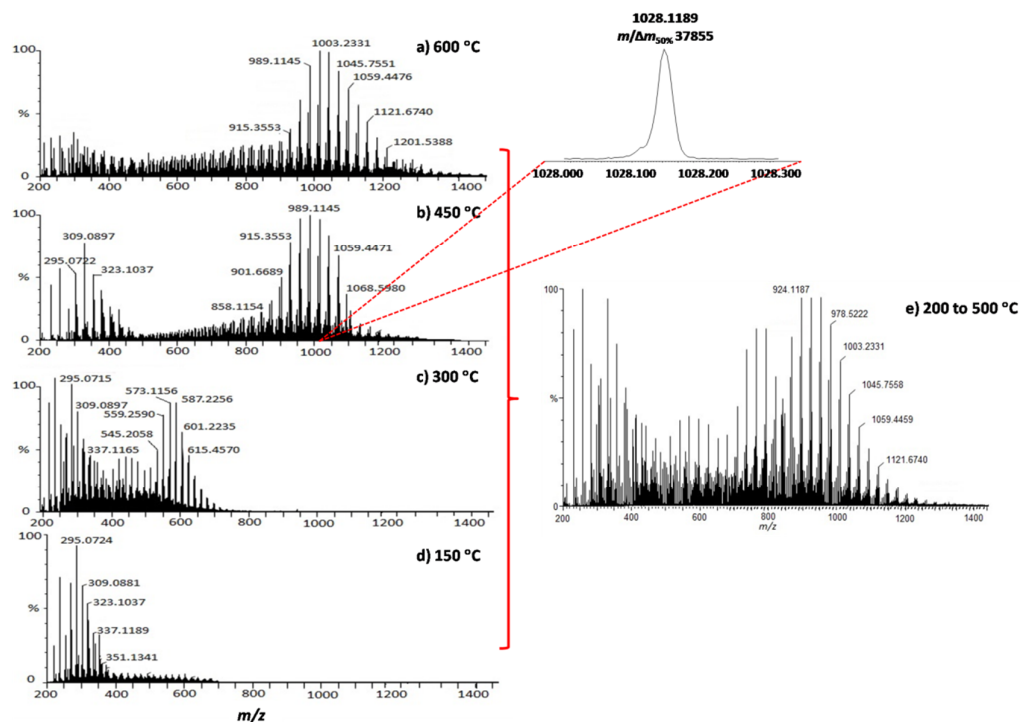


Figura 2.5 ASAP(+)MS para amostras de parafina a diferentes temperaturas.

O espectro por ASAP(+)MS a temperatura constant, 400 °C, também foi obtido para a parafina, Figura 2.6. Nesse caso, a classe de HCs são identificados apenas m/z 200 a 900.

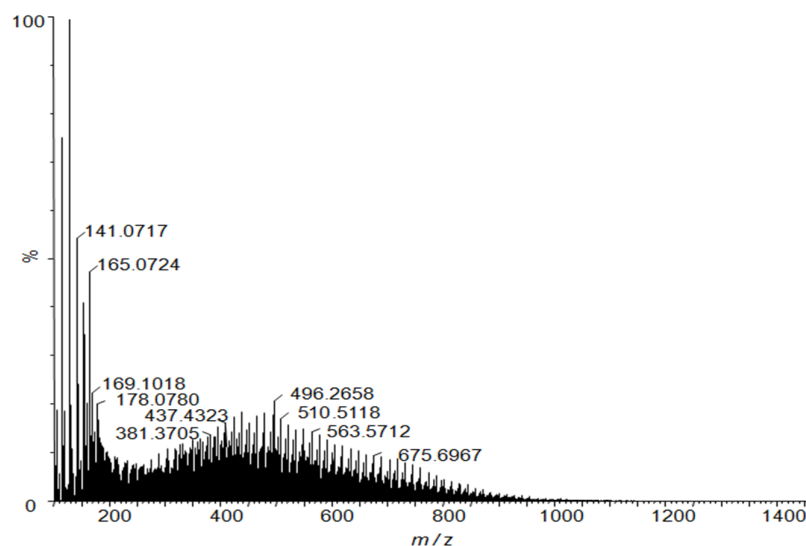


Figura 2.6 Espectro por ASAP(+)MS para parafina A em temperatura constante de 350 °C.

2.5 CONCLUSÃO

Os padrões de AC, óleo bruto e a parafina foram facilmente ionizados ASAP(+) MS, que determinou a composição química integralmente quando comparada com as fontes de ionização tradicionais (APCI, ESI, DESI, etc.). A partir de um gradiente de temperatura (150 a 600 °C) aplicado à fonte ASAP, um perfil químico em função do ponto de ebulição da amostra pode ser obtido, conferindo informações sobre o processo de refino, bem como a produção ou a qualidade do petróleo bruto. O ASAP favoreceu a detecção de uma maior amplitude de distribuição dos compostos, variando de m/z 200 a 1400 para frações saturadas e m/z 200 a 1300 para o óleo bruto. O ASAP também ionizou padrões AC com fragmentação mínima e sem preparo de amostra. Em geral, o acoplamento da técnica ASAP com analisadores de massa de alta resolução, como FT-ICR MS e Orbitrap, é uma ferramenta analítica promissora em petroleômica, permitindo a definição da composição elementar (C_cH_hN_nO_oS_s) e o DBE de moléculas com base na sua relação m/z .

Capítulo 3: Separação isomérica de Canabinóides por UPLC e Espectrometria de Mobilidade Iônica: *Traveling wave ion mobility mass spectrometry* (TWIMS-MS)

3.1 INTRODUÇÃO

A maconha é originária da planta *Cannabis sativa* L., que contém muitos compostos naturais diferentes, dos quais mais de 535 foram identificados e 70 são canabinóides. O termo canabinóide é atribuído ao grupo de moléculas composto de 21 átomos de carbono presentes na planta *Cannabis sativa* L (Boleda, 2007). Esses canabinóides são responsáveis pelos efeitos fisiológicos da planta e são classificados em dois grupos: psicoativos (Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), e Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)) e não-psychoativos (cannabinol (CBN), canabidiol (CBD), etc.) (Elsohly, 2005; Zulfiqar, 2010).

Além do Δ^9 -THC ($M_w = 314$ Da), outros cinco isômeros do Δ^9 -THC podem existir em amostras de maconha: Δ^9 -6aS,10aR-*cis*-tetrahydrocannabinol ((-)-*cis*- Δ^9 -THC), Δ^8 -*trans*-(6aR,10aR)-tetrahydrocannabinol (Δ^8 -*trans*-THC), (\pm)-1aS,3aR,8bR,8cR-canabicyclol (CBL- C_5), canabicromeno (CBC- C_5), e canabidiol (CBD- C_5) (Figura 3.1a). Entre eles, CBD- C_5 constitui até 40% de extratos de *Cannabis* e é responsável pelos efeitos psicológicos típicos da *Cannabis* em seres humanos (Zuardi, 2006). Em geral, possuem ações ansiolíticas e/ou antipsicóticas, enquanto outros isômeros do Δ^9 -THC exibem atividade não-biológica (Nascimento, 2015).

O principal precursor natural do Δ^9 -*trans*-THC- C_5 é Δ^9 -THCA- C_5 A/B (ácido Δ^9 -tetrahydrocannabinólico A e B, $M_w = 358$ Da), Figura 3.1b, o qual não possui efeitos psicotrópicos. Δ^9 -THCA pode sofrer descarboxilação quando aquecido ou fumado, resultando na conversão para Δ^9 -THC (Nascimento, 2015). Além do Δ^9 -THCA-A, outros quatro isômeros podem existir: CBDA- C_5 A, CBDA- C_5 , Δ^8 -*trans*-THCA- C_5 A, e CBLA- C_5 A, Figura 3.1b.

Figura 3.1c mostra canabidiol (CBN- C_5) e seus isômeros, cujas concentrações aumentam com o armazenamento ou envelhecimento da maconha devido à degradação do Δ^9 -THC- C_5 . O canabinodiol (CBND) e canabifurano (CBF- C_5), derivados do CBD- C_5 , são isômeros constitucionais do CBN- C_5 , com $M_w = 310$ Da.

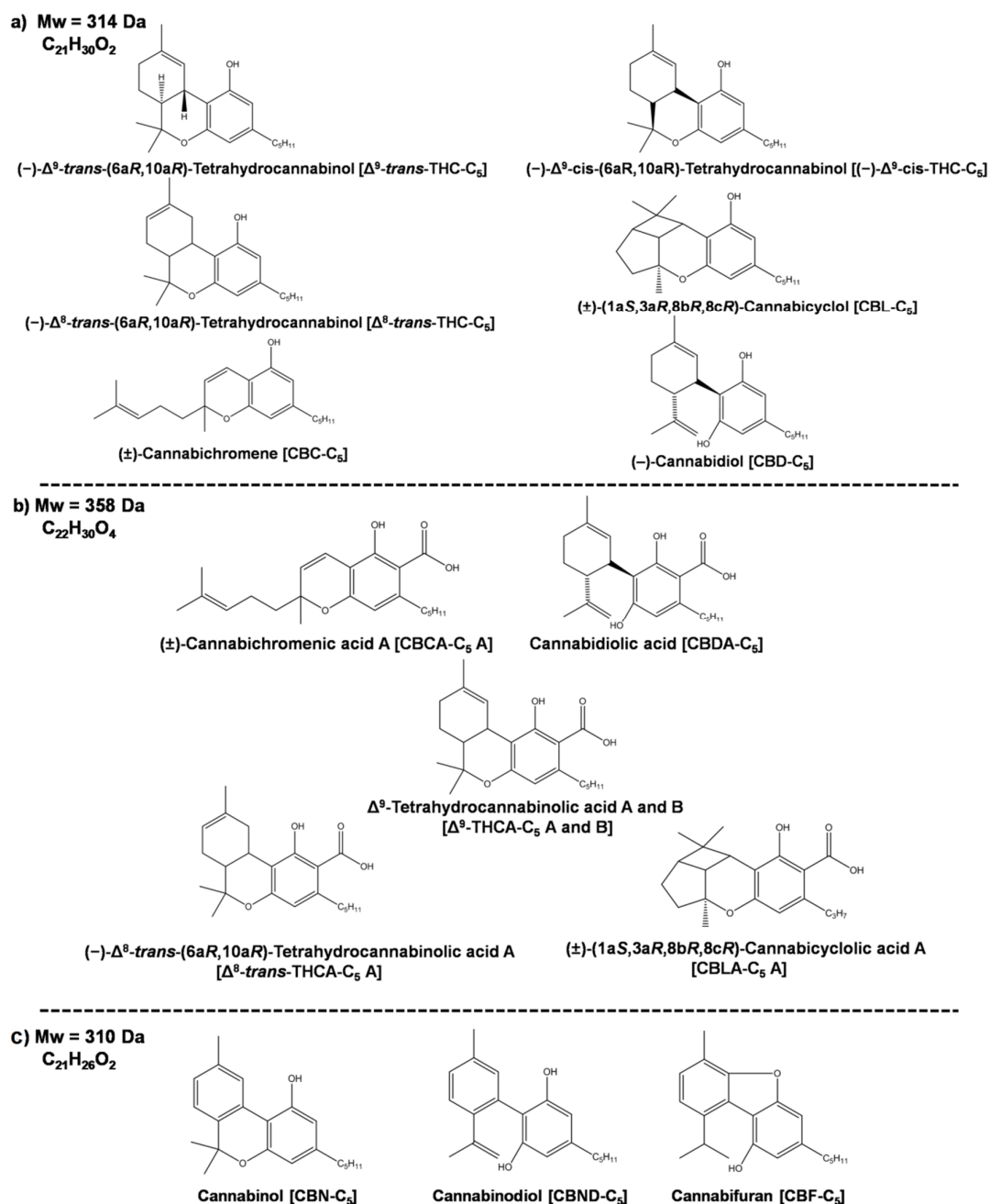


Figura 3.1 Estrutura química dos principais isômeros do (a) Δ^9 -*trans*-THC-C₅; (b) Δ^9 -THCA-C₅; e (c) CBN-C₅.

Segundo a Nações Unidas sobre Droga e Crime (*united nations office on drugs and crime* - UNODC), a maconha é a droga mais cultivada, traficada e consumida no mundo. De acordo com o relatório anual de 2015, cerca de 182 milhões de pessoas consumiram maconha em 2013 (Armenta, 2015). No mesmo ano, as apreensões de maconha pelas autoridades na América Latina e no Caribe aumentaram cerca de 20–

30%. Contudo, a quantidade de maconha apreendida na América do Norte foi maior (47% de aumento). Dessa forma, devido a complexidade da matriz, é necessário usar novos métodos analíticos com alta sensibilidade e seletividade para identificar os ingredientes ativos presentes nas amostras de maconha.

Nos laboratórios forenses brasileiros, os canabinóides são detectados qualitativamente pelo Teste Colorimétrico com *Fast Blue BB Salt*. Este teste é baseado no aparecimento de uma cor específica (usualmente rosa) na presença do Δ^9 -THC-C₅, CBN-C₅, ou CBD-C₅ (Fasciotti, 2013). Conforme Bordin *et al.*, a reação colorimétrica ocorre devido a natureza fenólica da estrutura química dos canabinóides (Williams, 2015). Contudo, este teste não é específico visto que outros compostos fenólicos também presentes em plantas podem levar a resultados falso-positivos (Kanu, 2008). Em 2016, Romão *et al.* identificou os produtos da reação colorimétrica entre Fast Blue BB Salt e amostras de maconha por espectrometria de massas de altíssima resolução (*Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry* (FT-ICR MS)), cromatografia em camada delgada (*Thin-layer chromatography* - TLC), e UV-Vis. Dessa forma, foi comprovado a maior seletividade do *Fast Blue BB Salt* que outros reagents como o *Fast Blue B Salt* (Fasciotti, 2013).

O desenvolvimento de métodos analíticos para análise de canabinóides envolve conceitos de química avançada e toxicologia forense. Entre as técnicas populares para análise de canabinóides destaca-se a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), que é usada para caracterizar principalmente o Δ^9 -THC-C₅ e seus metabólitos. Os resultados por GC-MS mostram excelente performance analítica, contudo a técnica requer várias etapas de preparação da amostra antes das análises instrumentais (Eiras, 2014).

O uso de técnicas mais sofisticadas também é relatado na literatura. Nascimento *et al.* encontrou 21 espécies de canabinóides usando ESI(-)-FT-ICR MS. No entanto, a principal dificuldade na identificação dos canabinóides por infusão direta, como no ESI(\pm), é a identificação dos isômeros (Nascimento *et al.*, 2012).

Técnicas analíticas hífenadas como cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com ionização por *electrospray*, LC-ESI-MS/MS (*liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry*) permite a diferenciação e quantificação de isômeros de canabinóides com LOD e LOQ inferiores aos observados por GC-FID (gas chromatography/flame ionization detector) e GC-MS. Schwöpe *et al.* realizaram experiências MS/MS com os principais isômeros de

canabinóides (Δ^9 -THC- C_5 e CBD- C_5), e ambos exibiram os mesmos perfis de fragmentação. No entanto, estes compostos foram distinguidos com base nos seus tempos de retenção na coluna cromatográfica, onde o CBD elui antes Δ^9 -THC. Além da fonte de ESI, outras fontes de ionização à pressão atmosférica foram usadas para estudar os canabinóides devido às suas características lipofílicas. A ionização química a pressão atmosférica (APCI), por exemplo, apresentou menores valores de LOD e LOQ em comparação com a fonte ESI (Eiras, 2015).

Além das técnicas acima referidas, a espectrometria de massa por mobilidade iônica (*ion-mobility spectrometry coupled mass spectrometry* (IMS-MS)) é considerada uma ferramenta analítica inovadora para a identificação de compostos isoméricos em matrizes complexas. Essa técnica baseia-se na diferença de mobilidade dos íons, em fase gasosa (*drift gas*), conforme sua carga, forma, tamanho e estrutura molecular. A separação ocorre numa escala de tempo de milissegundos, tornando-o adequado para o acoplamento com espectrometria de massa (MS), na qual a detecção ocorre geralmente por detectores de tempo-de-voo (TOF).

O IMS-MS pode ser acoplado com a espectrometria de massa por mobilidade iônica com *traveling wave* (TWIMS-MS). O Synapt G2-S HDMS, bem como o Agilent 1290 Infinity II combinam TWIMS-MS com alta resolução do TOF-MS. Este sistema é também favorável devido a possibilidade de acoplar várias técnicas cromatográficas e fontes de ionização antes da análise TWIMS-MS.

Em 2013, Ahonen *et al.* utilizaram TWIMS-MS como um método rápido para a separação dos isômeros de esteróides. Em 2015, Williams *et al.* investigou os metabólitos do câncer no epitélio de revestimento intestinal usando TWIMS-MS. Fasciotti *et al.* (2012) comparou a eficiência do Synapt TWIMS-MS G1 (primeira geração) e G2 (segunda geração) através de variações do *drift gas* (N_2 e CO_2), avaliando a mobilidade iônica de quatro isômeros de dissacarídeos em sua forma sodiada: maltose, lactose, sacarose e celobiose. A utilização do gás CO_2 mostrou melhora significativa da resolução, em comparação ao N_2 , para separação dos dissacarídeos em uma célula de mobilidade iônica do Synapt TWIMS G2.

Romão *et al.* aplicou ESI(+)-TWIMS-MS para distinguir três isômeros de posição do clorofenilpiperazina (*o*-CPP, *m*-CPP and *p*-CPP), vendida frequentemente como tabletes de *ecstasy* (Romão, 2011). A mobilidade iônica do *o*-CPP permitiu sua distinção de seus isômeros *m*-CPP e *p*-CPP usando CO_2 como *drift gas*. Armenta *et al.* usou TWIMS-MS para detectar e identificar novas substâncias psicoativas

(fenetilaminas, catinonas, canabinóides sintéticos, e triptaminas) (Armenta, 2015). Por fim, Gwak e Almirall estudaram 35 novas substâncias psicoativas usando Dt-IMS. No entanto, não existem estudos sobre a aplicação de TWIMS-MS para a separação de isômeros de canabinóides naturais (Gwak, 2015).

3.2 OBJETIVOS

Desenvolver metodologias para detectar a presença de isômeros de Δ^9 -*trans*-THC-C₅, Δ^9 -THCA-C₅, e CBN-C₅ em amostras de maconha e de haxixe, e partes da planta *Cannabis sativa* L. (flor e folha) pelo emprego de UPLC MS e infusão direta usando TWIMS MS (Synapt G2-S HDMS).

3.3 METODOLOGIA

Amostras e Reagentes

No âmbito de um convênio de cooperação com a Polícia Civil do Espírito Santo, cinco amostras de maconha, partes da planta *Cannabis sativa* L. (flor e folhas), e haxixe (extrato concentrado de Δ^9 -THC- C_5) foram obtidos. Acetonitrila (ACN), grau de pureza analítico >99.5% (Vetec Química Fina, Ltda, Brasil), foi usado para extração dos canabinóides e analisados no Synapt G2-S HDMS. Formeato de sódio, grau de pureza analítico >99.99% (Sigma-Aldrich Chemicals, USA), foram usados para calibrar o Synapt G2-S HDMS.

Preparo das amostras

Cerca de 2 mg de cada amostra foram colocados em diferentes microtubos contendo 1 mL de ACN, e depois a solução foi submetida a um banho de ultra-sons durante 15 min. Após a extração, foram diluídos 100 μ L da solução em 900 μ L de ACN para analisar no UPLC MS e TWIMS MS utilizando a fonte ESI em ambos os modos de ionização, isto é, ESI (+) e ESI (-), respectivamente. Os espectrômetros de massa usado foi um Synapt G2-S HDMS (Waters, Manchester, UK) com cromatógrafo UPLC-I Class (Waters, Manchester, UK).

UPLC-ESI(\pm)-TOF MS e ESI(\pm)-TWIMS-TOF MS

O sistema cromatográfico foi composto por um UPLC-I Class (Waters Acquity - Waters, Milford, MA, USA) acoplado ao espectrômetro de massas TWIMS MS, Synapt G2-S HDMS (espectrômetro de massas de alta definição, Manchester, UK). Este equipamento possui a geometria híbrida, compreendendo analisadores quadrupolares e de tempo de voo (TOF). A eluição cromatográfica foi em solvente binário, razão A/B (fase A = água/ácido fórmico 0.1% v/v; fase B = metanol/ácido fórmico 0.1% v/v). A vazão foi 0.50 μ L.min⁻¹. As condições de análise foram: 10% fase B em 0 min; 60% fase B em 8 min; 95% fase B em 10 min; 95% fase B em 12 min; e após 2 min, a análise retornou à condição inicial. O analisador TOF foi operado com poder de resolução de $m/\Delta m_{50\%} = 45000$ (onde $m/\Delta m_{50\%}$ é a largura do pico a meia altura em torno de $m/z \approx 400$), e foi calibrado com formeato de sódio 0.1% em acetonitrila/água 1:1 (v/v %) num alcance de m/z 100 - 700. A cela de transferência e acumulação de íons foi operada a pressão de 10⁻² mbar de argônio. Nos experimentos de mobilidade e

separação de íons foi usado gás N₂. A aquisição e processamento de dados foram no *software Mass Lynx 4.1 (Waters Corporation)*. Os parâmetros da fonte ESI e da célula de mobilidade iônica estão listados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Parâmetros da fonte de ESI e Célula de mobilidade iônica.

Parâmetros	ESI(-)	ESI(+)
Voltagem do capilar	2.5 kV	3.5 kV
Temperatura da fonte	90°C	90°C
Voltagem do cone	40 V	50 V
Temperatura de dessolvatação	150°C	200°C
Fluxo do gás de dessolvatação (N ₂)	500 L/h	500 L/h
Taxa de acumulação	0.1 s/scan	0.1 s/scan
<i>Traveling wave height</i>	29.0 V	40.0 V
<i>Traveling wave speed</i>	650 m/s	652 m/s
Pressão do nitrogênio (<i>drift gas</i>)	2.90 mbar	2.90 mbar

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

UPLC-ESI(±)-TOF MS

As Figuras 3.2a e b mostram os cromatogramas obtidos por UPLC-TOF MS no modo *full-scan* de aquisição para os extratos de haxixe usando ESI(+) e ESI(-), respectivamente, que utiliza o sistema UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) acoplado ao TOF MS para separar os principais canabinóides e seus isômeros, simultaneamente. Os sinais *m/z* 315 e 311 para ESI(+) e 345, 309, 353 e 357 para ESI(-) foram detectados, e correspondem à mistura isomérica de canabinóides, como listado na Tabela 3.2. No modo ESI(+), foram identificados três picos referentes ao íon *m/z* 315 [C₂₁H₃₀O₂-H]⁺ com os tempos de retenção de t = 5.48, 5.87, e 7.70 min, e dois picos correspondentes ao íon *m/z* 311 [C₂₁H₂₆O₂-H]⁺ com t = 5.18 min e 8.12 min. O erro de massas variou de 3 a 6 ppm, como mostrado na Figura 3.2a. Os picos intensos em 5.48 min (*m/z* 315) e 5.18 min (*m/z* 311) provavelmente indicam a presença dos canabinóides Δ⁹-THC e CBN, respectivamente, visto que o haxixe é conhecido por conter altas concentrações de Δ⁹-THC, e CBN, que é um subproduto da degradação do Δ⁹-THC. Além disso, esses canabinóides possuem tempos de eluição semelhantes (t = 5.48 e 5.18, respectivamente). Os picos restantes correspondem aos seus respectivos

isômeros ($t = 8.12$ min: CBND ou CBF; e $t = 5.87$ e 7.70 : (-)-*cis*- Δ^9 -THC, Δ^8 -trans-THC, CBL- C_5 , CBC- C_5 , CBD- C_5 ou CBG- C_5).

Analisando os cromatogramas no modo negativo de ionização, ESI(-), Figura 3.2b, a molécula CBN é detectada novamente, agora na sua forma desprotonada, como íon $[M-H]^-$ m/z 309 e $t = 5,18$ min, e como uma das espécies mais abundantes. Outros três íons também foram encontrados: m/z 345, 353, e 357. Entre eles, apenas o íon $[C_{22}H_{26}O_4-H]^-$ m/z 353,1774 com erro de massas de 7,7 ppm foi identificado como ácido canabinólico (CBNA). Para os íons m/z 345 ($t = 3,35$; $3,65$; $4,05$; e $4,35$ min) e 357 ($t = 4,68$; $6,43$; $6,57$; e $8,81$ min), podem existir vários isômeros constitucionais ou isóbaros, com no máximo seis estruturas químicas. Os dois íons detectados como m/z 345.2080 são citados na literatura como isômeros do ácido canabielsóico (CBEA- C_5 A ou CBEA- C_5 B), enquanto o íon m/z 357,2086 $[C_{22}H_{30}O_4-H]^-$ pode se referir a CBDA, Δ^9 -THCA- C_5 A/B, Δ^8 -THCA- C_5 A, CBLA- C_5 A, ou ácido canabicromenico. O pico em $t = 6,57$ min provavelmente corresponde ao Δ^9 -THCA- C_5 A/B, que é o precursor do Δ^9 -THC. Em geral, os íons são detectados com erro de massas de 3–9 ppm.

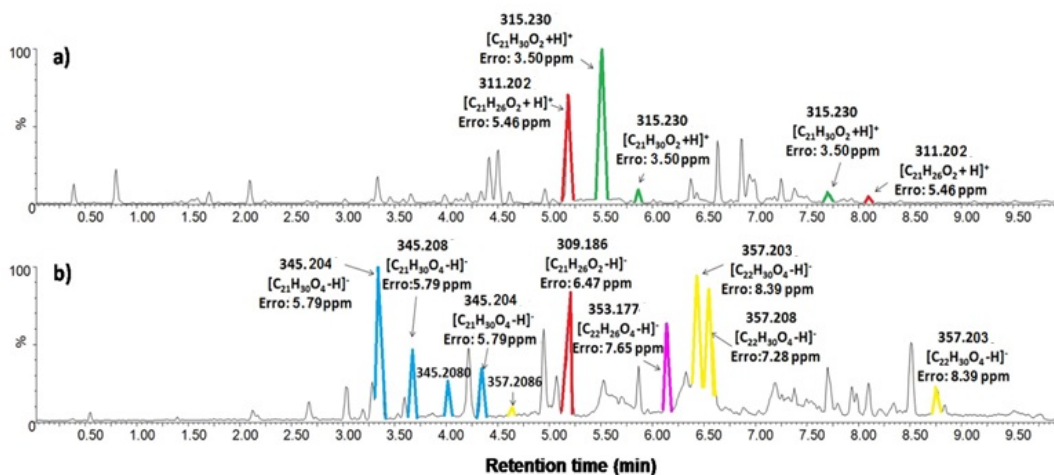


Figura 3.2 Cromatogramas de uma típica amostra de haxixe por (a) UPLC-ESI(+)TOF MS, e (b) UPLC-ESI(-)TOF MS.

Tabela 3.2 Valores medidos e teóricos para m/z , fórmula molecular e tempo de retenção em amostras de haxixe por UPLC-ESI(\pm)-TOF MS.

m/z medido	m/z teórico	$[M+H]^+/[M-H]^-$	Tempo de retenção (min)
311.2023	311.2006	$[C_{21}H_{26}O_2+H]^+$	5.18; 8.12
315.2308	315.2319	$[C_{21}H_{30}O_2+H]^+$	5.48; 5.87; 7.70
309.1869	309.1849	$[C_{21}H_{26}O_2-H]^-$	5.21
345.2040; 345.2080	345.2060	$[C_{21}H_{30}O_4-H]^-$	3.35; 3.65; 4.05; 4.35
357.2030; 357.2086	357.2060	$[C_{22}H_{30}O_4-H]^-$	4.68; 6.43; 6.57; 8.81

Para melhorar a eficiência da coluna e sensibilidade do método por UPLC-TOF MS, a detecção dos canabinóides em misturas isoméricas foram também adquiridos cromatogramas no modo de monitoramento de único íon (SIM) para os íons m/z 311, 315, e 357.

A Figura 3.3a–c mostra os cromatogramas no modo SIM para os íons m/z 311, 315, e 357, respectivamente, obtidos por UPLC-ESI(\pm)-TOF MS. Na Figura 3.3a, cinco picos correspondem ao íon m/z 311. Além dos dois isômeros detectados previamente ($t = 5.18$ and 8.12 min), Figura 3.2a, três picos adicionais com intensidades inferiores são vistos em $t = 7.19$, 7.74 e 8.40 min. Deste modo, foi identificado um total de cinco isômeros, e este número é superior aos isômeros constitucionais referidos na Figura 3.1c. Para o íon m/z 315, um pico adicional é identificado em $t = 7.38$ min, resultando na detecção de três isômeros para o Δ^9 -THC, Figura 3.3b. Portanto, quatro dos seis possíveis isômeros (Δ^9 -THC- C_5 , CBD- C_5 , CBL- C_5 , Δ^9 -*cis*-THC- C_5 , Δ^8 -*trans*-THC- C_5 , e CBC- C_5) são identificados, Figura 3.1a. Para o íon m/z 357, que é o precursor da molécula Δ^9 -THC e com tempo de retenção de 6.57 min (Δ^9 -THCA- C_5 A/B), outros isômeros/isóbaros com menor abundância estão presentes em $t = 7.95$ min, resultando em um total de cinco compostos com m/z 357.

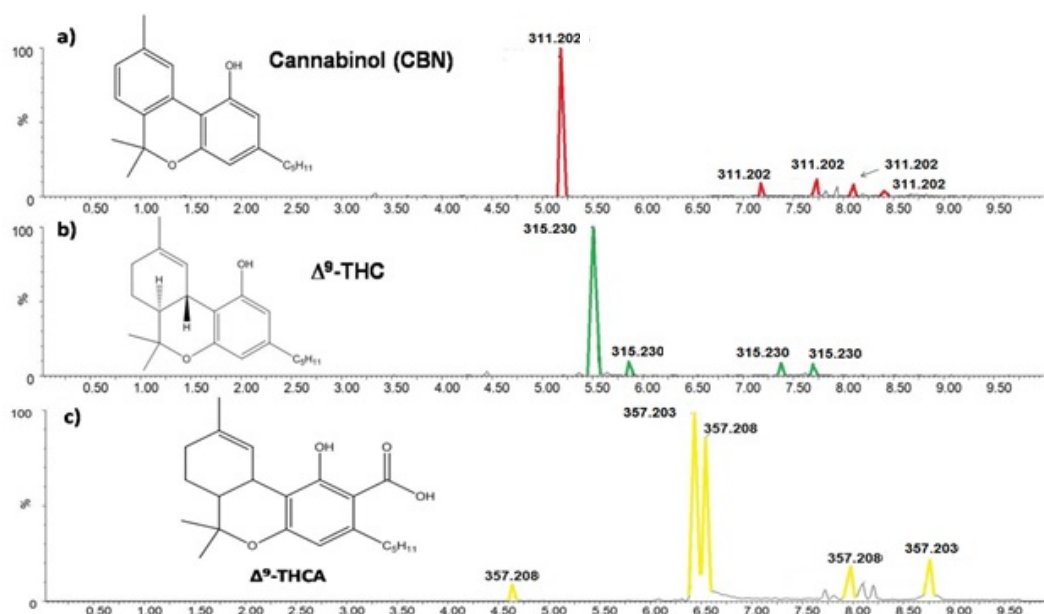


Figura 3.3 Cromatogramas por UPLC-ESI(±)-TOF MS no modo SIM para os íons (a) m/z 311; (b) m/z 315 e (c) m/z 357.

A Figura 3.4a–f mostra os cromatogramas por UPLC-ESI(+)-TOF MS (3.4a–c) e UPLC-ESI(-)-TOF MS (3.4d–f) para extratos de haxixe (3.4a) e (3.4d), e partes da planta *Cannabis sativa* L. (flor: (3.4b) e (3.4e); folha: (3.4c) e (3.4f)). Observa-se que uma maior quantidade de canabinóides é identificada no haxixe, seguido por flor e folha. Usando UPLC-ESI(+)-TOF MS, os íons m/z 311 e 315 ($t = 5.18$ e 5.48 min, respectivamente) foram detectados como compostos majoritários nos extratos de haxixe e de flor, enquanto que para o extrato da folha, apenas o íon m/z 311 foi encontrado. Os resultados por UPLC-ESI(-)-TOF MS mostram que o íon m/z 357 é majoritário em todos os casos ($t = 6.43$ e 6.57 min).

Δ^9 -THC pode ser encontrado em diferentes partes da planta em várias porcentagens: i) 20–60 wt% no haxixe; ii) 10–12 wt% nas flores; iii) 1–2 wt% nas folhas; iv) 0.1–0.3 wt% nos galhos; e v) < 0.03 wt% nas raízes (Santos, 2016). Esses valores estão de acordo com os picos de alta intensidade observados para o Δ^9 -THC, e seus precursores (Δ^9 -THCA- C_5 , m/z 357), e os produtos de degradação (CBN, m/z 311 ou 309) (Watanabe, 2007).

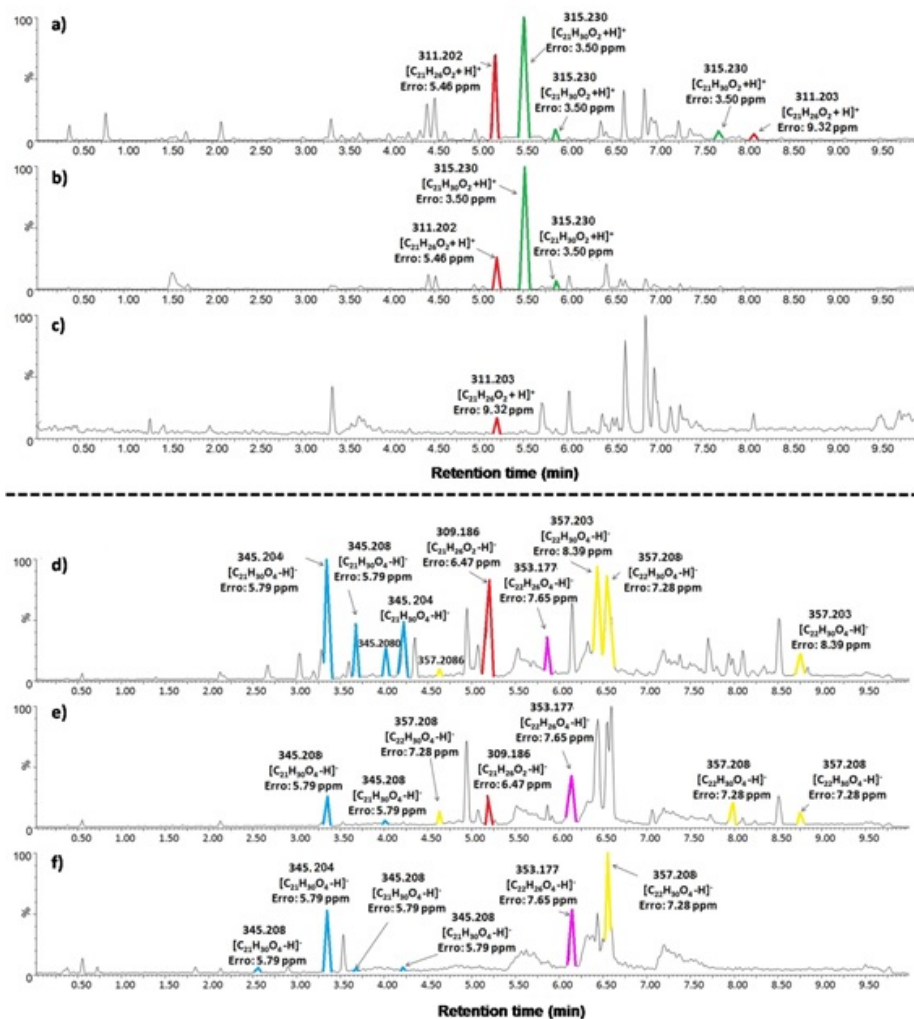


Figura 3.4 Cromatogramas por UPLC-ESI(+)-TOF MS e UPLC-ESI(-)-TOF MS para os extratos de haxixe ((a) e (d)), e partes da planta *Cannabis sativa* L.: flor ((b) e (e)), e folha ((c) e (f)).

Cinco amostras de maconha também foram analisadas por UPLC-ESI(±)-TOF MS, Figura 3.5. No modo ESI(+), o $[C_{21}H_{26}O_2 + H]^+$ íon m/z 311 é sempre mais abundante e detectado em $t = 5.18$ min, enquanto no modo ESI(-), uma quantidade maior de canabinóides é observada (sinais m/z 309, 345, 353 e 357). Semelhante aos resultados do ESI(+), o íon CBN é detectado em m/z 309 ($t = 5.21$ min), Figura 3.5. Diferente dos resultados mostrados na Figura 3.4, Δ^9 -THC é detectado em baixa concentração, Figura 3.5. Isto pode ser atribuído à degradação do composto, conduzindo à sua conversão em moléculas de CBN. Adicionalmente, os dímeros de canabinóides (m/z 637 (328 + 310 Da), 653 (326 + 328 Da), e 681 (354 + 328 Da)) são também identificados no modo ESI (-), tais como íon $[M+N-H]^-$, onde M e N correspondem a

diferentes canabinóides (Watanabe, 2007). Estes resultados concordam com Nascimento *et al.*, que afirmou que a presença dessas espécies pode ser explicada pela formação de ligações covalentes através da desprotonação de grupos fenólicos (Δ^9 -THC, CBN, etc.) com grupos carboxílicos (Δ^9 -THCA e seus isômeros) (Nascimento *et al.*, 2015).

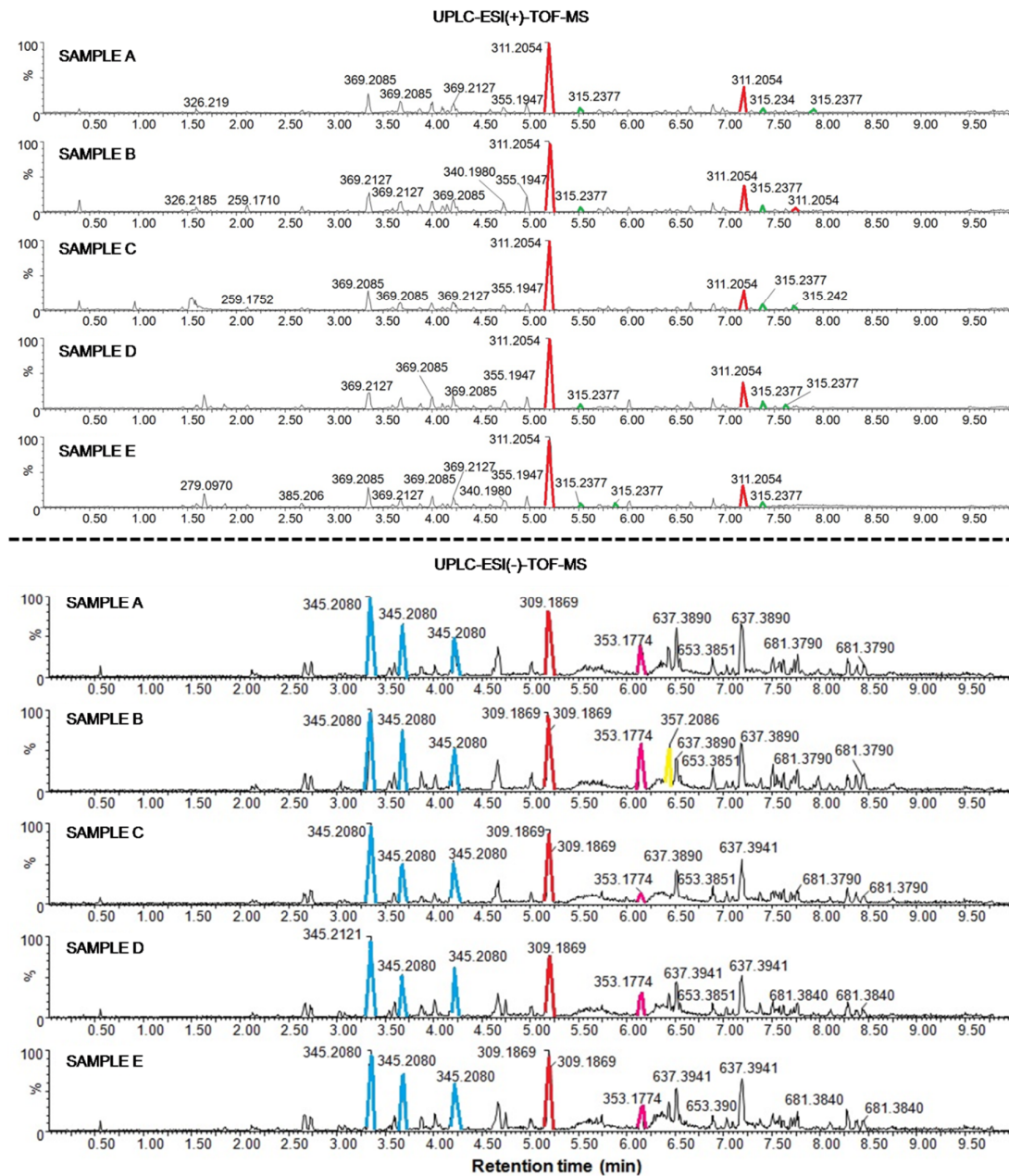


Figura 3.5 Cromatogramas por UPLC-ESI(±)-TOF MS para cinco amostras de rua de maconha.

TWIMS-MS

Entre as amostras exploradas, o extrato de haxixe é notavelmente rico em misturas isoméricas de canabinóides, o que o torna ideal para avaliar o desempenho da técnica TWIMS-MS na separação das referidas misturas.

Inicialmente, a separação de íons com o mesmo m/z só é possível se houver diferenças de conformação, configuração espacial ou carga entre espécies. A técnica MS mede a relação m/z de íons, enquanto o IMS atribui um espectro no *drift time* para cada valor m/z , criando uma nova dimensão de dados. Ao determinar a mobilidade iônica de uma mistura isomérica, é importante calcular a resolução (R_{p-p}) entre os picos de mobilidade. No entanto, R_{p-p} depende do fator de separação entre os picos (α), definido como:

$$\alpha = \frac{td_2}{td_1} \quad (1)$$

Uma característica importante deste trabalho é a comparação do desempenho do TWIMS-MS, considerando a rapidez em termos de análise e não requer separação física prévia da amostra.

As Figuras 3.6a–b e 3.7a–b mostram o *drift times* para os íons m/z 357 (3.6a) e m/z 313 (3.6b), íons desprotonados ($[M-H]^-$) obtidas usando ESI(-), e para os íons m/z 311 (3.7a) e 315 (3.7b), íons protonados ($[M+H]^+$) obtidas usando ESI(+), respectivamente. A separação isomérica dos três compostos foi observada na maioria dos casos. Na Tabela 3.3 estão listados o R_p para cada pico, que varia de 0.36 para 0.89, assim como os valores de α e R_{p-p} , onde $\alpha > 1$ indica uma separação satisfatória entre os picos por mobilidade iônica.

Tabela 3.3 Poder de resolução (R_p), fator de separação (α) e resolução pico-a-pico (R_{p-p}) obtidos por dados de TWIMS-MS.

Modo de ionização	m/z	Drift time (ms)	R_p	Par de isômeros	α	R_{p-p}
ESI(-)	357 (Δ^9 -THCAA)	0.83 (A)	0.47	B ; A	1.90	0.19
		1.58 (B)	0.44	B ; C	1.47	
		2.33 (C)	0.89	C ; A	2.81	
	313 (Δ^9 -THC)	0.83 (A)	0.45	B ; A	2.00	0.17
		1.66 (B)	0.43	B ; C	1.45	
		2.41 (C)	0.69	C ; A	2.90	
ESI(+)	311 (CBN)	3.69 (A)	0.72	B ; A	1.26	0.10
		4.65 (B)	0.79	B ; A	1.26	
	315 (Δ^9 -THC)	2.47 (A)	0.63	B ; A	1.76	0.10
		4.36 (B)	0.36	B ; C	1.28	
		5.57 (C)	0.39	C ; A	2.25	

Os íons m/z 357 e 313, Figuras 3.6a-b, mostram perfil similar do *drift time* (detecção de três picos de mobilidade iônica) com maior abundância de *drift time* com valores 1.58 e 1.66 ms, respectivamente. Esses valores correspondem as espécies Δ^9 -THCAA e Δ^9 -THC, respectivamente. Além disso, é obtida uma melhor eficiência de separação isomérica no modo ESI (-), Figura 3.6, em comparação com o modo ESI (+), Figura 3.7, como evidenciado pelos valores de α obtidos a partir das relações entre pares de isômeros, Tabela 3.3.

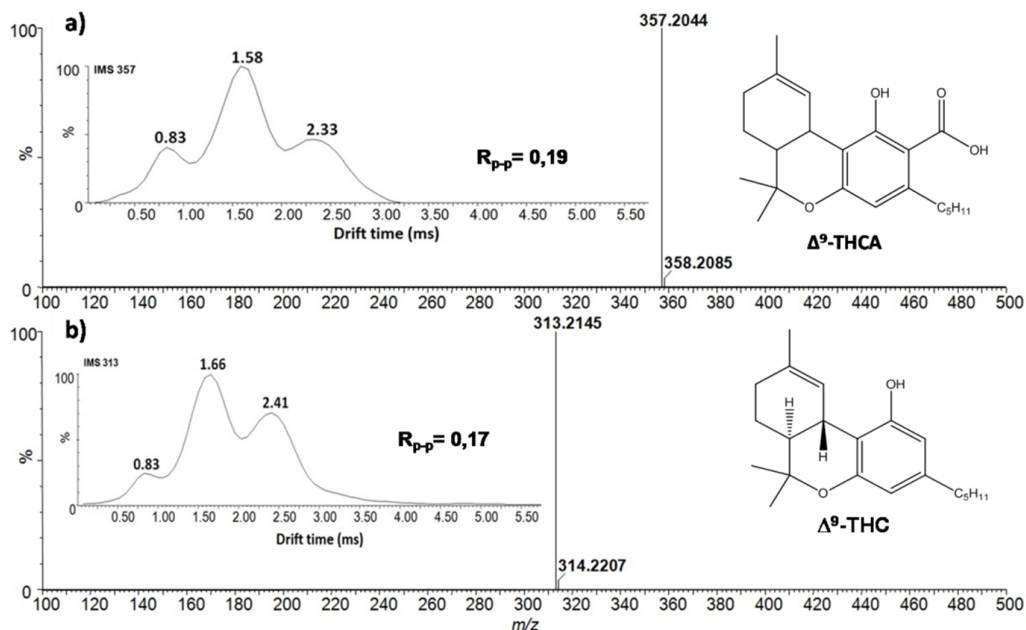


Figura 3.6 O perfil de mobilidade para os íons m/z (a) 357 e (b) 313 obtidos por ESI(-)TWIMS-MS. Em ambos casos é notável a separação isomérica de três compostos.

Os resultados ESI(+)TWIMS-MS para os íons m/z 311 e 315, Figura 3.7, mostrou baixa resolução cromatografica ao comparar os valores R_{p-p} e α na Tabela 3.3. Os perfis do *drift time* para Δ^9 -THC e seus isômeros foram similares em ambos modos de ionização, Figuras 3.6b e 3.7b.

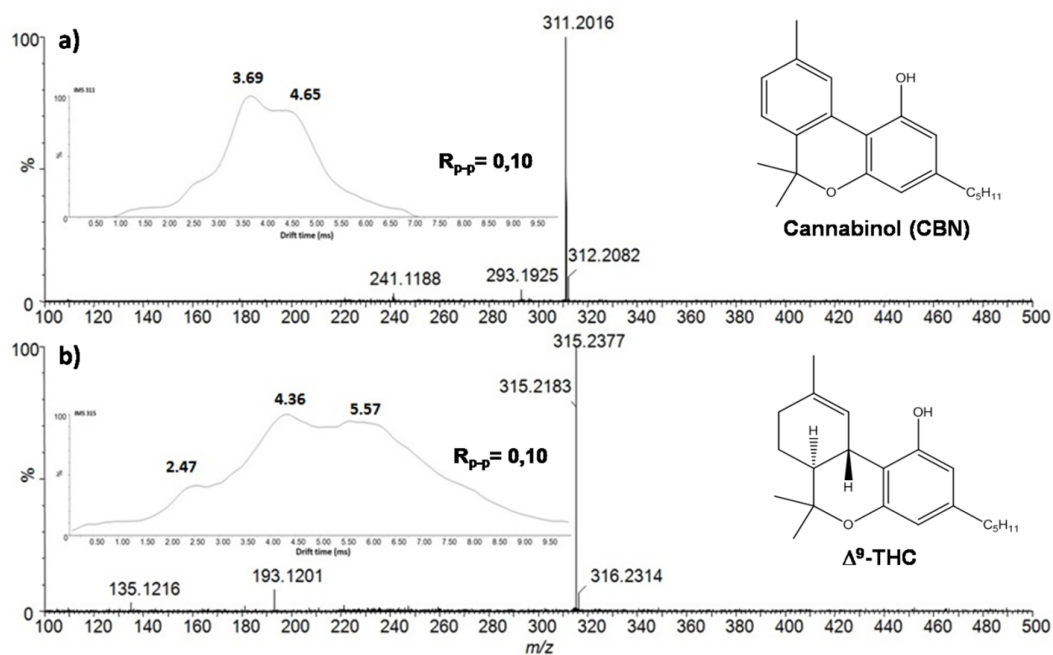


Figura 3.7 Os perfis de mobilidade para os íons m/z (a) 311 e (b) 315 obtidos por ESI(+)-TWIMS-MS.

3.5 CONCLUSÃO

A cromatografia líquida de alta performance (UPLC) acoplado a espectrometria de massas assim como a espectrometria de massas de mobilidade iônica com *traveling wave* (TWIMS-MS) foram aplicadas as amostras de haxixe, maconha e partes da planta *Cannabis sativa* L. (flor e folha) para identificar a presença de uma mistura isomérica complexa contendo principalmente canabinóides tais como Δ^9 -THC, canabidiol (CBN-C₅, M_w = 310 Da), e ácido Δ^9 -tetrahydrocanabinólico A e B (Δ^9 -THCA-C₅ A/B, M_w = 358 Da). Um máximo de três isômeros foram identificados para os íons m/z 315/313, 311, e 357 usando a técnica de ESI-TWIMS MS, enquanto no modo SIM de aquisição de íons usando UPLC-ESI-TOF MS apresentou maior seletividade, havendo a separação isomérica de quatro a cinco compostos. Os principais íons encontrados corresponderam ao CBN-C₅, Δ^9 -THC, ácido canabielsióco, Δ^9 -THCA-C₅, e seus isômeros. Estudos futuros serão desenvolvidos usando padrões de referência de canabinóides para identificar e quantificar suas espécies isoméricas.

4.1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, houve aumento do uso da Espectrometria por Mobilidade Iônica (*Ion Mobility Spectrometry* – IMS) pela ampla variedade de aplicações, alcançando desde moléculas pequenas a grandes complexos moleculares (Kanu, 2008; Zhong, 2010; Wyttenbach, 2014). Esta necessidade desencadeou o desenvolvimento de uma ampla variedade de analisadores IMS (por exemplo: *drift-tube* IMS, *traveling wave ion guide*, and *trapped ion mobility spectrometry*) (McDaniel, 1973) e seu acoplamento com diferentes analisadores de massas (*mass spectrometry* - MS) (por exemplo: *time-of-flights*, *linear ion traps*, *orbitraps* e FT-ICR MS). Esses avanços do IMS-MS foram ainda mais popularizados por sua comercialização em principalmente seis plataformas: DT-IMS-MS (Agilent), FAIMS (Thermo), TWIMS-MS (Waters), e TIMS-MS (Bruker Daltonics).

Vários grupos mostraram as vantagens do IMS-MS para misturas complexas no campo da metabolômica, proteômica e petroleômica. Uma observação comum é a possibilidade de separar classes químicas por suas linhas de tendência IMS-MS, medição da *collision cross sections* (CCS), menor tempo de análise, fácil acoplamento a outras técnicas de separação (por exemplo, cromatografia gasosa e líquida). Com o advento dos analisadores de mobilidade alta resolução ($R > 80$), houve um impulso natural para a sua integração aos analisadores de massas de alta resolução para a análise de misturas complexas (Fernandez-Lima, 2011; Fernandez-Lima, 2009; Benigni, 2016).

No presente trabalho, avaliamos o desempenho de um analisador TIMS quando acoplado a TOF-MS e FT-ICR MS para a análise de um padrão de mistura complexo (isto é, padrão de Ácido Fúlvico proveniente do Rio Suwannee - USA). O objetivo é estudar a reprodutibilidade do TIMS, faixa de aplicabilidade e possíveis desafios durante a análise de rotina (Ridgeway, 2016; Benigni, 2017).

4.2 OBJETIVOS

Avaliar o desempenho de um analisador TIMS quando acoplado a TOF MS e FT-ICR MS para a análise de uma mistura complexa, verificando a reprodutibilidade do TIMS, a faixa de aplicabilidade e os desafios durante a análise.

4.3 METODOLOGIA.

Preparo de amostras

Padrão de ácidos fúlvicos do Rio Suwannee (*Suwannee River Fulvic Acid Standard II - SRFA*) foi fornecido pela *International Humic Substances Society* (St. Paul, MN). O padrão de calibração de massas (ESI-L tuning mix G1969-85000) foi comprado da Agilent Technologies (Santa Clara, CA). Cinco padrões, propil galato, ácido 2,4,5-trimetoxibenzóico, ácido 2-metoxi-1-naftóico, ácido 3-metoxi-2-naftóico e ácido 4-metoxi-1-naftóico, comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). SRFA e os padrões foram dissolvidos 50:50 v/v metanol/água até a concentração final de 1 ppm. Todas amostras foram adicionados 5% (v/v) do padrão de calibração Tuning Mix. Todos solvents usados foram grau de pureza LC-MS ou maior, obtido por Fisher Scientific (Pittsburgh, PA).

Fonte ESI

A fonte de ionização por *electrospray* (Apollo II ESI design, Bruker Daltonics, Inc., MA) foi usada para todas as análises no modo negativo de ionização. As soluções das amostras foram introduzidas no nebulizador à um fluxo de 360 $\mu\text{L/h}$. As condições típicas de operação foram: 3000–3500 V de voltagem do capilar; 10 L/min do fluxo do gás de secagem, 1.0 bar da pressão do gás de nebulização, e 180 °C para temperatura do gás de secagem.

Análises por Espectrometria de Mobilidade Iônica (Trapped Ion Mobility Spectrometry)

O conceito da *Trapped Ion Mobility Spectrometry* (TIMS) é fundamentado no uso de um campo elétrico que matem os íons em uma fase estacionária contra um fluxo de gás, de modo que a força do gás de arraste é compensada pelo campo elétrico e os pacotes de íons são separados através do eixo do analisador TIMS com base na sua mobilidade (Hernandez, 2014). Durante a separação por mobilidade, um campo quadrupolar confina os íons na direção radial para aumentar a eficiência de aprisionamento. Um esquema simplificado do analisador TIMS é mostrado na Figura 4.1.

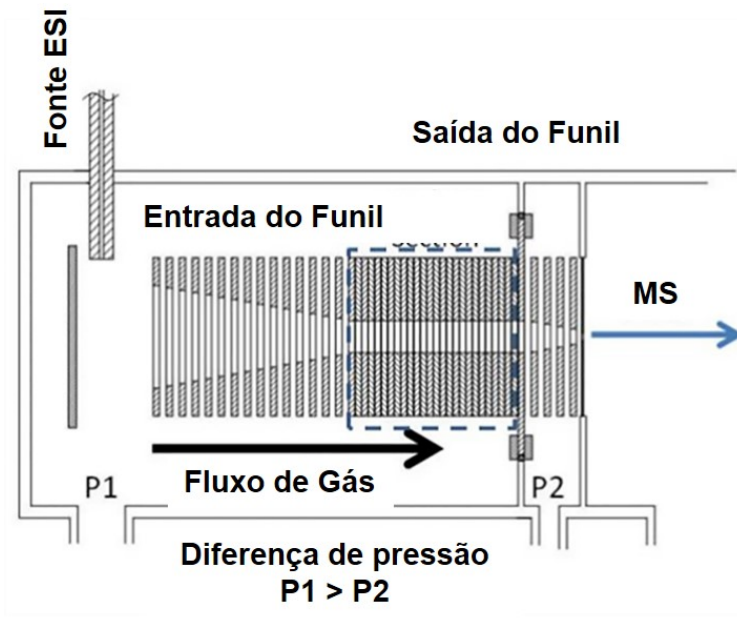


Figura 4.1 Esquema do analisador TIMS.

Fonte: Fernandez-Lima, 2016.

A mobilidade, K , para um íon na cela TIMS é descrito pela equação:

$$K = \frac{v_g}{E} \cong \frac{A}{(V_{eluição} - V_{saída})} \quad (1)$$

onde v_g , E , $V_{eluição}$ e $V_{saída}$ são a velocidade do gás, campo elétrico aplicado, voltagem de eluição e voltagem de saída do funil, respectivamente. Os espectros de mobilidade foram calibrados usando um padrão de calibração Tuning Mix (Tunemix, G2421A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) com os seguintes valores de mobilidade (K_0) para os íons m/z 622 $K_0=1.025$, m/z 922 $K_0=0.840$, m/z 1222 $K_0=0.724$, m/z 1522 $K_0=0.643 \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Schenk, 2014).

Os valores de mobilidade (K) são correlacionados com a *collision cross section* (CCS) do íon-neutro (Ω , \AA^2) usando a equação:

$$\Omega = \frac{(18\pi)^{1/2}}{16} \frac{z}{(k_B T)^{1/2}} \left(\frac{1}{m_I} + \frac{1}{m_b} \right)^{1/2} \frac{1}{K} \frac{760}{P} \frac{T}{273.15} \frac{1}{N^*} \quad (2)$$

onde z é a carga do íon, k_B é a constante de Boltzmann, N^* é o número de densidade e m_I e m_b são a massa do íon e do gás, respectivamente (McDaniel, 1973).

Analises por TIMS-TOF MS

Os experimentos por TIMS-TOF MS foram realizados em um equipamento customizado com um analisador TIMS acoplado ao espectrômetro de massas maXis Impact Q-ToF (Bruker Daltonics Inc., MA). O funil TIMS é controlado usando um *in-house software*, National Instruments Lab VIEW, que é sincronizado com o programa de aquisição usado pelo maXis Impact Q-ToF. A separação TIMS foi realizada usando nitrogênio como gás a 300 K, e a velocidade do fluxo de gás foi controlado pela diferença de pressão entre a entrada ($P_1 = 3.1$ mbar) e a saída do funil ($P_2 = 1.0$ mbar). Os valores P_1 e P_2 foram mantidos constantes para todos experimentos. Uma RF constante (2020 kHz e 200 Vpp) foi aplicada a todos eletrodos incluindo a entrada do funil, a seção de separação por mobilidade iônica, e saída do funil. Defletor (V_{def}), entrada do funil (V_{fun}), voltagem do analisador ($V_{\text{saída}}$) e rampa de voltagem (V_{ramp}) foram $V_{\text{def}} = -150/-150$ V, $V_{\text{fun}} = -90$ V, $V_{\text{out}} = -60$ V e $V_{\text{ramp}} = 150/-20$ V. A célula TIMS foi operada usando os seguintes parâmetros: *fill/trap/ramp/wait* correspondentes a 10/10/93/10 ms. Um total de 500 acumulações foram realizadas por cada experimento no TIMS-TOF MS.

Analises por TIMS-FT-ICR MS

Os experimentos TIMS-FT-ICR MS foram realizados em um equipamento customizado com um analisador TIMS acoplado ao espectrômetro de massas FT-ICR MS 7T Solarix equipado com uma célula de ICR (Bruker Daltonics Inc., MA). O analisador TIMS é controlado usando um *in-house software*, National Instruments Lab VIEW, que é sincronizado com o programa de aquisição usado pelo FT-ICR MS 7T Solarix. A separação por TIMS foi realizada usando gás nitrogênio a 300 K, $P_1 = 2.2$ e $P_2 = 0.9$ mbar, e RF constante (2200 kHz e 140-160 Vpp). A célula TIMS foi operada usando os parâmetros *fill/trap/elute/quench* correspondentes a 9/3/9/3 ms, usando uma media de 1000 IMS *scans* por espectro de massas e um gradient de diferencial de tensão ΔE de 5.0 V. O gradiente de tensão da rampa ΔV_{ramp} foi -160 a -60, em total de 400 *steps*. O defletor (V_{def}), funil de entrada (V_{fun}), voltagem do analisador ($V_{\text{saída}}$) e uma rampa de voltagem (V_{ramp}) foram $V_{\text{def}} = -180/180$ V, $V_{\text{fun}} = -90$ V, $V_{\text{saída}} = -50$ V e $V_{\text{ramp}} = -80$ V/80V. Os espectros por TIMS-FT-ICR MS atingiram um poder de resolução de $R \sim 400,000$ para m/z 400.

Processamento de dados

Os espectros de TIMS-TOF MS e TIMS-FT-ICR MS foram externamente calibrados por massas e mobilidade usando o padrão de calibração Agilent ESI-L. As formulas moleculares foram calculadas usando o *software* Composer (Versão 1.0.6, Sierra Analytics, CA) e confirmado com DataAnalysis (Bruker Daltonics v 4.2) usando a formula mínima $C_xH_yN_{0-3}O_{0-19}S_{0-1}$. Das fórmulas de íons geradas, a *double bond equivalence* (DBE) foi calculada pela equação:

$$DBE = C - \frac{H}{2} + \frac{N}{2} + 1 \quad (3)$$

onde C, H e N são os números de carbonos, hidrogênio e nitrogênio na formula química.

Por meio do *software* Data Analysis (Version v. 5.1, Bruker Daltonics, CA), os dados dos espectros de mobilidade iônica foram externamente calibrados e extraídos a partir dos dados brutos do TIMS-MS. Os espectros TIMS para cada formula molecular foi processado usando um *software* customizado SAME (Software Assisted Molecular Elucidation), especificamente construído para o processamento de dados 2D TIMS-MS. [44] O *software* SAME trata-se de uma rotina construída no Python v2.7, onde as informações finais são em termos de [m/z ; chemical formula; K; CCS] para cada dado TIMS-MS. Os gráficos de contorno 2D TIMS-MS foram gerados no DataAnalysis (Version v. 5.1, Bruker Daltonics, CA) e os outros gráficos foram gerados usando o OriginPro 2016 (Originlab Co., MA).

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.

As análises de SRFA usando TIMS acoplado ao TOF MS e FT-ICR MS, mostrou uma única linha de tendência no domínio IMS-MS composta de espécies carregadas individualmente (Figura 4.2). O número de compostos moleculares identificadas no domínio MS e IMS-MS está diretamente relacionado ao poder de resolução dos analisadores TIMS e MS. A investigação no domínio MS leva à observação de uma única distribuição gaussiana centrada em torno de m/z 400, independentemente do analisador de MS. Em uma inspeção minuciosa dos espectros MS permitiu a identificação de 4950 e 7760 sinais a partir das projeções TOF MS e FT-

ICR MS, respectivamente. Assumindo a fórmula geral $C_xH_yN_{0-3}O_{0-19}S_{0-1}$, foram atribuídas 1430 e 3050 fórmulas químicas a partir dos sinais TOF e FT-ICR MS, respectivamente. De maneira geral, 80% dos compostos químicos identificados corresponderam a compostos oxigenados (O_1-O_{18}), mostrando coerência com observações anteriores (Kim, 2003). O processamento dos conjuntos de dados TIMS-MS usando o algoritmo SAME levou à observação de 7600 e 22350, no domínio da mobilidade, por TIMS-TOF MS e TIMS-FT-ICR MS, respectivamente.

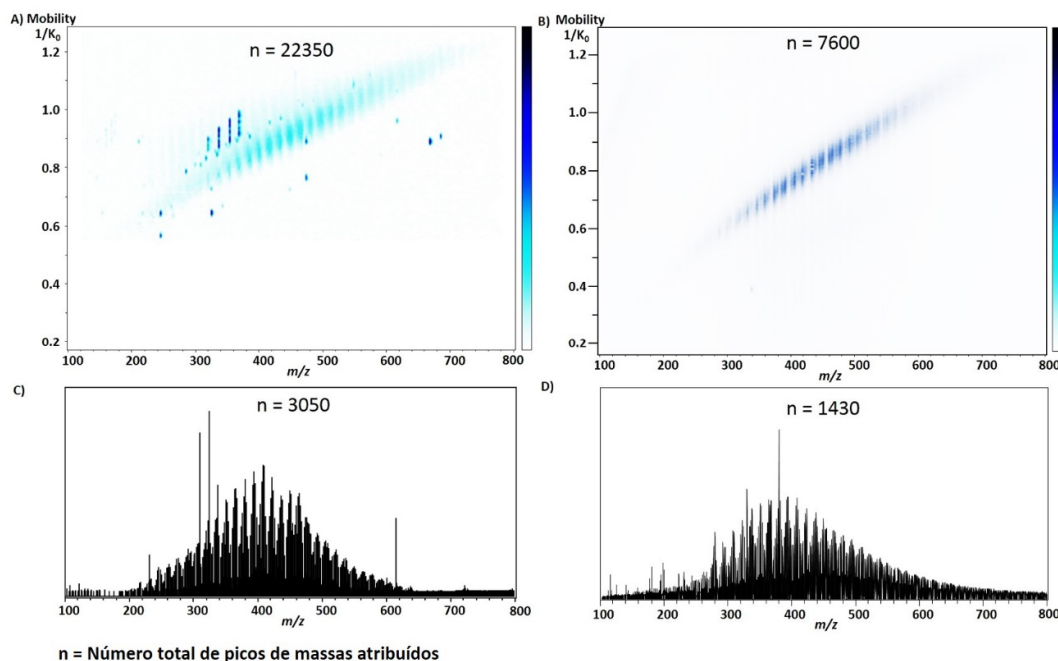


Figura 4.2 Gráficos de contorno 2D-TIMS-MS e projeções MS para SRFA obtidos por TIMS-FT-ICR MS (esquerda) e TIMS-TOF MS (direita).

O desempenho do TIMS-TOF e do TIMS-FT-ICR MS foram avaliadas usando os padrões m/z 301,9981 [$C_6H_2F_9N_3O-H$]⁻ e 601,9789 [$C_{12}H_2F_{21}N_3O-H$]⁻ do padrão interno Tuning Mix (Figura 4.3), utilizado para calibração externa. Foi possível uma atribuição química direta com precisão inferior a 2 ppm e poder de resolução de massa típico de 30-40k e 150-350k usando TOF MS e FT-ICR MS, respectivamente. Uma inspeção detalhada dos perfis de mobilidade mostrou boa correlação, com poder de resolução de mobilidade na faixa de 80-100 e boa precisão (< 0,5% de erro) para os íons m/z 301, $1/K_0 = 0.669 \text{ cm}^{-2} \text{ V s}$ e m/z 601, $K_0 = 0.878 \text{ cm}^{-2} \text{ V s}$. Este resultado ilustra a versatilidade do analisador TIMS, bem como a reprodutibilidade dos resultados, independentemente do analisador MS.

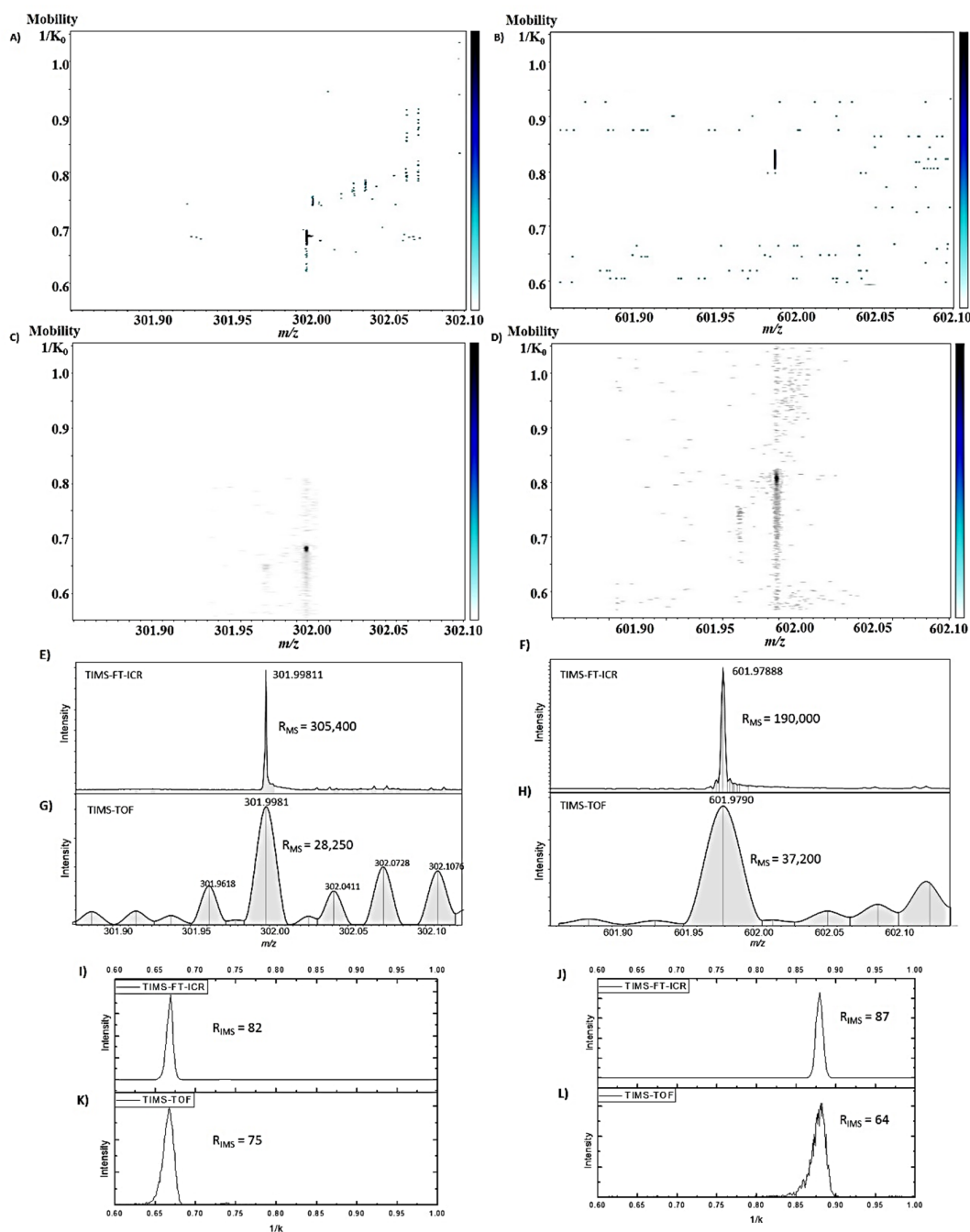


Figura 4.3 Gráficos de contorno 2D-TIMS MS, projeções MS e IMS usando TIMS-FT-ICR MS (a, c, e, g, i, k) e TIMS-TOF MS (b, d, f, h, j, l) para m/z 301 e 601 a partir do Tuning Mix.

Ao observar as fórmulas químicas identificadas revelamos que, à medida que o m/z aumenta a necessidade de maior poder de resolução torna-se significativa na definição do número de compostos identificados, principalmente quando objetivo é separar os compostos no nível da massa nominal comparando o poder de resolução do

TOF MS em relação ao FT-ICR MS (Figura 4.4). Ambos analisadores detectam a mesma distribuição dos compostos oxigenados (O1 - O18), contudo significativas diferenças são observadas quanto ao número de compostos, mostrando concordância com observações anteriores (Blackburn, 2017). Conclusões semelhantes podem ser extraídas dos diagramas de Van Krevelen pelas razões molares de H/C e O/C, onde os compostos saturados (por exemplo, lipídios e peptídeos), compostos carboxílicos alicíclicos (por exemplo, ligninas e taninos), hidrocarbonetos insaturados e regiões aromáticas condensadas são identificados em maior intensidade para FT-ICR MS comparado ao TOF MS (Wang, 2017). As maiores diferenças entre os resultados por TOF-MS e FT-ICR MS estão na região dos compostos carboxílicos alicíclicos.

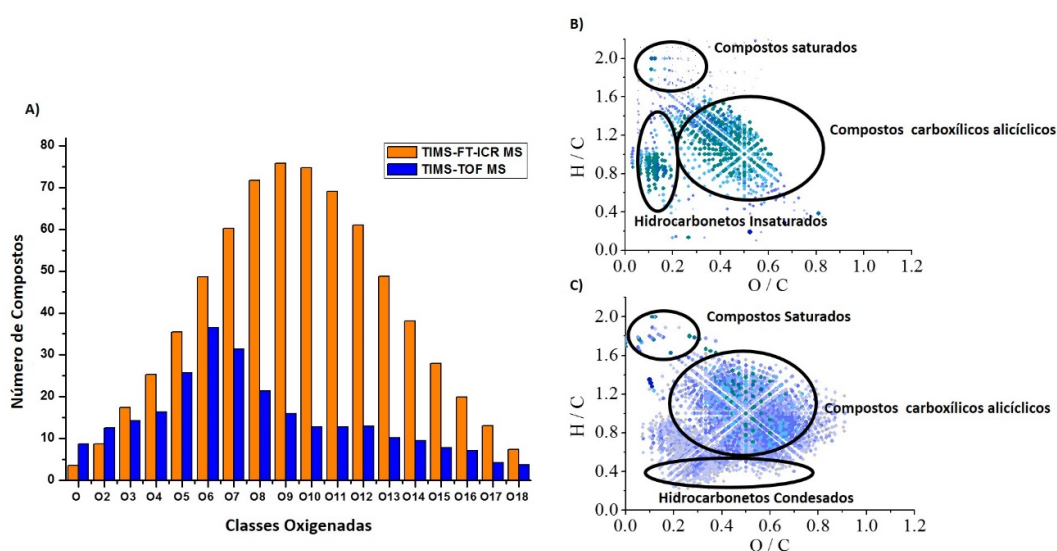


Figura 4.4 Gráfico de distribuição de classes oxigenadas (a) e Diagrama de Van Krevelen obtidos das análises do SRFA usando TMS-TOF MS (b) e TMS-FT-ICR MS (c).

A diversidade estrutural das moléculas presentes no SRFA e o desempenho do analisador TMS-MS são ilustrados pelo emprego de moléculas padrões, cujo estruturas e grupo funcionais são semelhantes aos encontrados no SRFA (Figura 4.5 e 4.6). Ao analisar a região de m/z 201, o FT-ICR MS ($R \sim 300k$) e o TOF-MS ($R \sim 14k$) detectaram quatro sinais de m/z distintos (Tabela 4.1), dos quais o algoritmo SAME atribuiu as amplas bandas de mobilidade (IMS) a existência de 4 a 7 isômeros estruturais por fórmula química. As análises dos padrões isoméricos ácido 2-metoxi-1-naftóico, ácido 3-metoxi-2-naftóico e ácido 4-metoxi-1-naftóico mostram na Figura 4.5 uma única banda IMS para os íons $[M-H]^-$ ($[C_{12}H_9O_3]^-$), com valor de CCS bastante

similar ($<2\text{\AA}^2$), que podem ser correlacionados com a maior banda IMS observada para o íon $[\text{C}_{12}\text{H}_9\text{O}_3]^-$ presente em SRFA. Esses resultados sugerem que a amostra de SRFA contém pelo menos um desses padrões, e que vários isômeros podem não estar totalmente resolvidos.

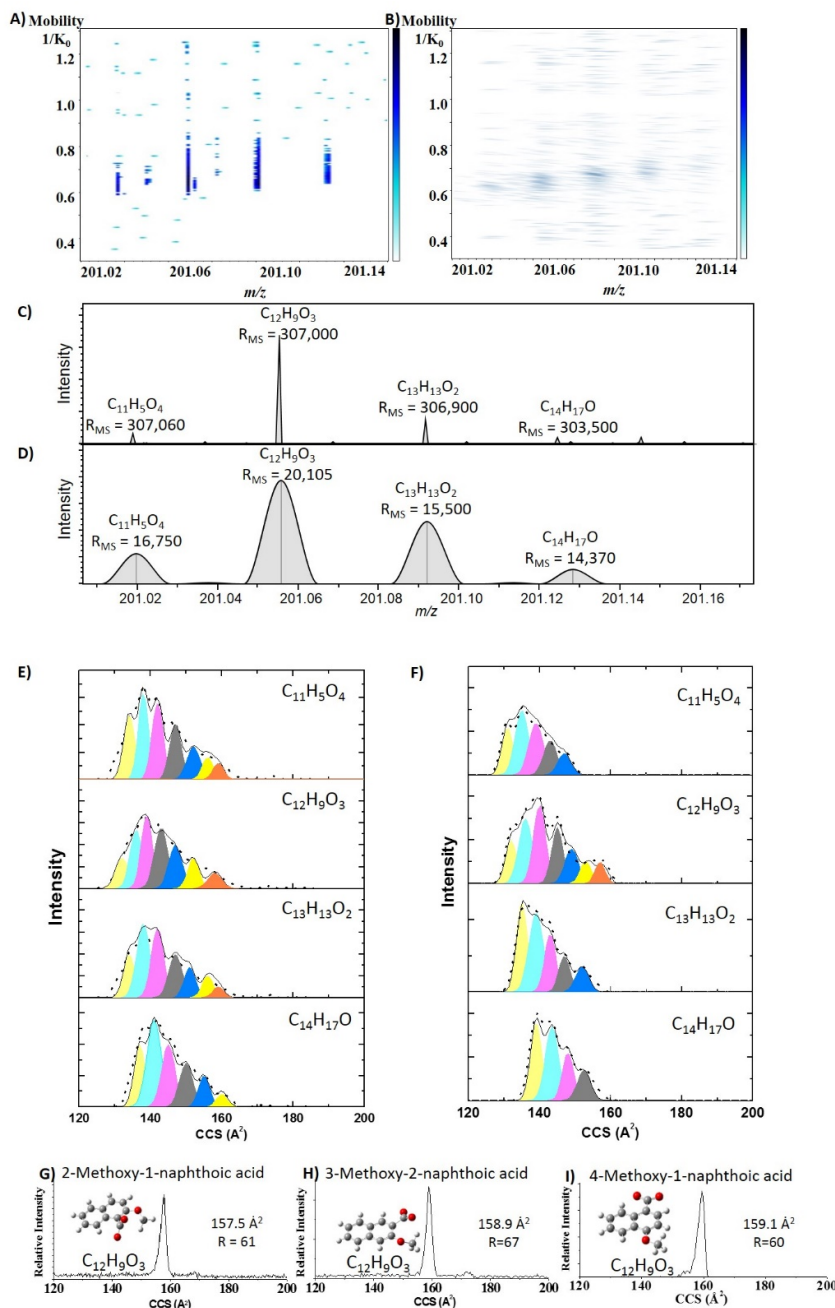


Figura 4.5 Gráficos de contorno 2D-TIMS MS, projeções MS e IMS para SRFA usando TIMS-FT-ICR MS (a, c, e) e TIMS-TOF MS (b, d, f) em m/z 201. Perfis de mobilidade para os padrões isoméricos ($[\text{M}-\text{H}]^-$): ácido 2-metoxi-1-naftóico (g), ácido 3-metoxi-2-naftóico (f) e ácido 4-metoxi-1-naftóico (l). Observe a presença do íon

[C₁₂H₉O₃]⁻ da análise do SRFA, cujo as bandas de mobilidade possuem valores de CCS semelhante aos padrões.

Tabela 4.1 Resumo de fórmulas químicas e CCS (N₂) na faixa de m/z 201

Experimental m/z (± 0.001)	Fórmula iônica	Massa teórica	Error (ppm)	CCS [Å ²]
ESI(-)-TIMS-FT-ICR MS				
201.01924	C ₁₁ H ₅ O ₄	201.01933	0.45	133 - 156
201.05559	C ₁₂ H ₉ O ₃	201.05572	0.65	132 - 158
201.09205	C ₁₃ H ₁₃ O ₂	201.09210	0.25	134 - 159
201.12843	C ₁₄ H ₁₇ O	201.12849	0.30	138 - 159
ESI(-)-TIMS-TOF MS				
201.0189	C ₁₁ H ₅ O ₄	201.01933	1.99	132 - 152
201.0555	C ₁₂ H ₉ O ₃	201.05572	0.99	132 - 158
201.0922	C ₁₃ H ₁₃ O ₂	201.09210	-0.50	134 - 151
201.1280	C ₁₄ H ₁₇ O	201.12849	2.49	138 - 159

Na faixa de m/z 211, o FT-ICR MS ($R \sim 150k$) e o TOF-MS ($R \sim 14k$) detectaram seis sinais de m/z distintos (Tabela 4.2), dos quais o algoritmo SAME atribuiu as amplas bandas de IMS à existência de 3 a 5 isômeros estruturais por fórmula química (Figura 4.6). A análise dos padrões do ácido 2,4,5-trimetoxibenzóico e propil galato mostra uma única banda de mobilidade para os íons [M-H]⁻, com valores de CCS muito distintos ($\sim 20 \text{ Å}^2$ de diferença), onde o CCS do galato de propila e o ácido 2,4,5-trimetoxibenzóico corresponde a segunda e última banda do íon [C₁₀H₁₁O₅]⁻ para SRFA. Dessa forma, os resultados sugerem que a amostra SRFA provavelmente contém ambos os compostos.

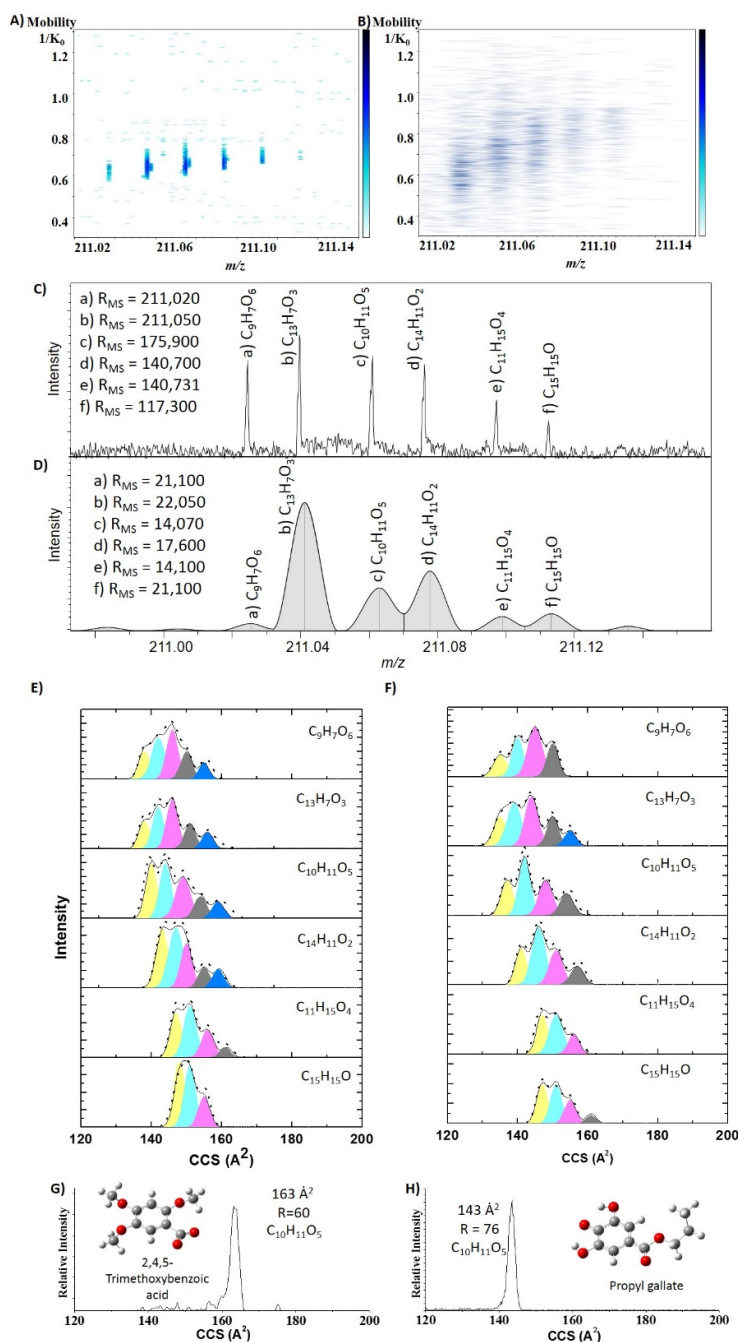


Figura 4.6 Gráfico de contorno 2D-TIMS MS, projeções MS e IMS para SRFA usando TIMS-FT-ICR MS (a, c, e) e TIMS-TOF MS (b, d, f) em m/z 211. Perfis de mobilidade para os padrões isoméricos ([M-H]⁻): ácido 2,4,5-trimetoxibenzóico (g) e propil galato (h). Observe a presença do íon [C₁₀H₁₁O₅]⁻ da análise do SRFA, cujo as bandas de mobilidade possuem valores de CCS semelhante aos padrões.

Tabela 4.2 Resumo de fórmulas químicas e CCS (N₂) na faixa de m/z 211

Experimental m/z (± 0.001)	Fórmula iônica	Massa teórica	Error (ppm)	CCS [Å ²]
ESI(-)-TIMS-FT-ICR MS				
211.02472	C ₉ H ₇ O ₆	211.02481	0.43	138 - 156
211.04005	C ₁₃ H ₇ O ₃	211.04007	0.08	138 - 157
211.06119	C ₁₀ H ₁₁ O ₅	211.06120	0.03	140 - 159
211.07641	C ₁₄ H ₁₁ O ₂	211.07645	0.20	143 - 160
211.09756	C ₁₁ H ₁₅ O ₄	211.09758	0.11	147 - 160
211.11279	C ₁₅ H ₁₅ O	211.11284	0.23	148 - 155
ESI(-)-TIMS-TOF MS				
211.0245	C ₉ H ₇ O ₆	211.0248	1.4	138 - 151
211.0405	C ₁₃ H ₇ O ₃	211.0401	-1.9	138 - 157
211.0619	C ₁₀ H ₁₁ O ₅	211.0612	-3.3	140 - 154
211.0760	C ₁₄ H ₁₁ O ₂	211.0765	2.1	143 - 155
211.0970	C ₁₁ H ₁₅ O ₄	211.0976	2.8	147 - 156
211.1125	C ₁₅ H ₁₅ O	211.1128	1.6	147 - 161

Enquanto o desempenho do TOF MS é suficiente para resolver compostos de baixa massa molecular atingindo resultados próximos do FT-ICR MS, essa situação muda à medida que o m/z aumenta. No caso do íon m/z 465, devido a alta complexidade química requer o uso de MS de ultra alta resolução. Isso é visualizado na Figura 4.7, onde o TOF MS identificou os oito compostos mais abundantes, enquanto o FT-ICR MS consegue detectar doze compostos, mostrando uma distribuição de menor intensidade contendo quatro compostos (Figura 4.7). Apesar da diferença no poder de resolução de massa entre os analisadores, observa-se uma boa concordância nos perfis de mobilidade e no número de características identificadas usando o algoritmo SAME para os compostos mais abundantes em massa nominal (Tabela 4.3).

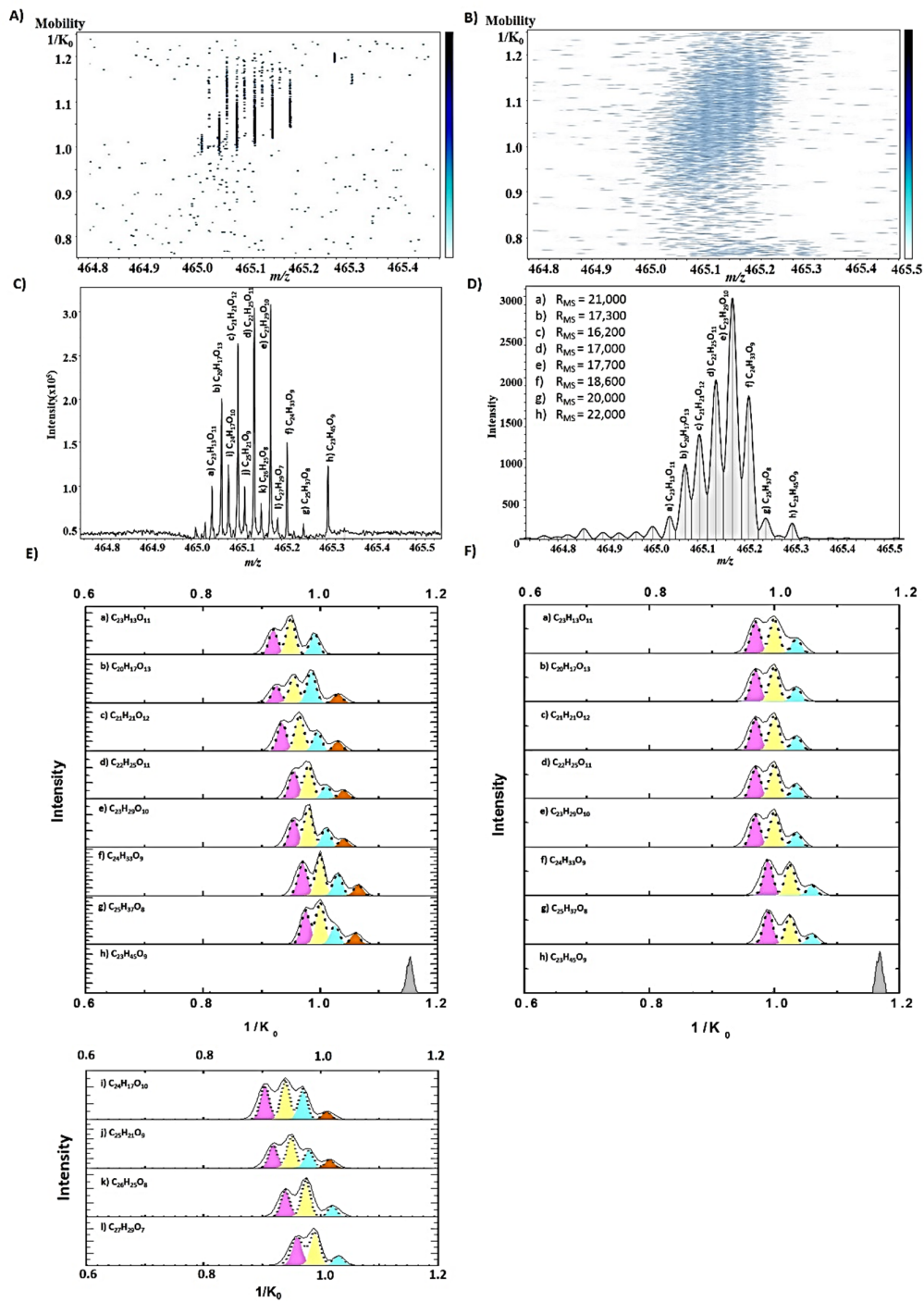


Figura 4.7 Gráfico de contorno 2D-TIMS MS, projeções MS e IMS para SRFA usando TIMS-FT-ICR MS (a, c, e) e TIMS-TOF MS (b, d, f) em m/z 465.

Tabela 4.3 Fórmulas químicas e CCS (N₂) na faixa de m/z 465.

Experimental m/z (± 0.001)	Fórmula iônica	Massa teórica	Error (ppm)	$1/K_0$ [cm ² /v·s]
ESI(-)TIMS-FT-ICR MS				
465.04671	C ₂₃ H ₁₃ O ₁₁	465.04633	-0.80	0.92-0.99
465.06770	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₃	465.06746	-0.55	0.92-1.03
465.08290	C ₂₄ H ₁₇ O ₁₀	465.08272	-0.39	0.92-0.97
465.10411	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	465.10385	-0.56	0.93-1.03
465.11923	C ₂₅ H ₂₁ O ₉	465.11911	-0.27	0.93-1.01
465.14047	C ₂₂ H ₂₅ O ₁₁	465.14024	-0.51	0.95-1.04
465.15561	C ₂₆ H ₂₅ O ₈	465.15549	-0.26	0.94-1.02
465.17684	C ₂₃ H ₂₉ O ₁₀	465.17662	-0.47	0.96-1.04
465.19204	C ₂₇ H ₂₉ O ₇	465.19188	-0.34	0.96-1.03
465.21326	C ₂₄ H ₃₃ O ₉	465.21301	-0.55	0.97-1.07
465.30666	C ₂₃ H ₄₅ O ₉	465.30691	-0.54	0.98-1.06
465.24924	C ₂₅ H ₃₇ O ₈	465.24939	0.32	1.15
ESI(-)TIMS-TOF MS				
465.0455	C ₂₃ H ₁₃ O ₁₁	465.0463	1.7	0.97-1.04
465.0664	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₃	465.0675	2.4	0.97-1.04
465.1034	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	465.1038	0.9	0.97-1.04
465.1408	C ₂₂ H ₂₅ O ₁₁	465.1402	-1.3	0.97-1.04
465.1763	C ₂₃ H ₂₉ O ₁₀	465.1766	0.7	0.97-1.04
465.2121	C ₂₄ H ₃₃ O ₉	465.2130	1.9	0.99-1.06
465.2486	C ₂₅ H ₃₇ O ₈	465.2494	1.7	0.99-1.06
465.3058	C ₂₃ H ₄₅ O ₉	465.3069	2.4	1.16

O espaço conformacional em função das classes oxigenadas e do DBE para misturas complexas, como SRFA, pode fornecer informações adicionais sobre a diversidade estrutural (Figura 4.8). Enquanto um número maior de compostos pode ser identificado usando o TIMS-FT-ICR MS em relação ao TIMS-TOF MS, uma boa concordância é observada nos gráficos DBE *vs* m/z e CCS *vs* m/z para o SRFA. Como tendência geral, à medida que o m/z aumenta, os heteroátomos com maior teor de oxigênio são observados. Além disso, uma ampla distribuição é observada nos domínios DBE e CCS, independentemente do número de oxigênio (ver detalhes nas Figuras 4.9 - 4.12). Moléculas menores têm compostos com baixo número de oxigênio, DBE de 3-15 e CCS de 125-225 Å², enquanto moléculas maiores são mais oxigenadas, DBE de 7-23 e CCS de 200-225 Å².

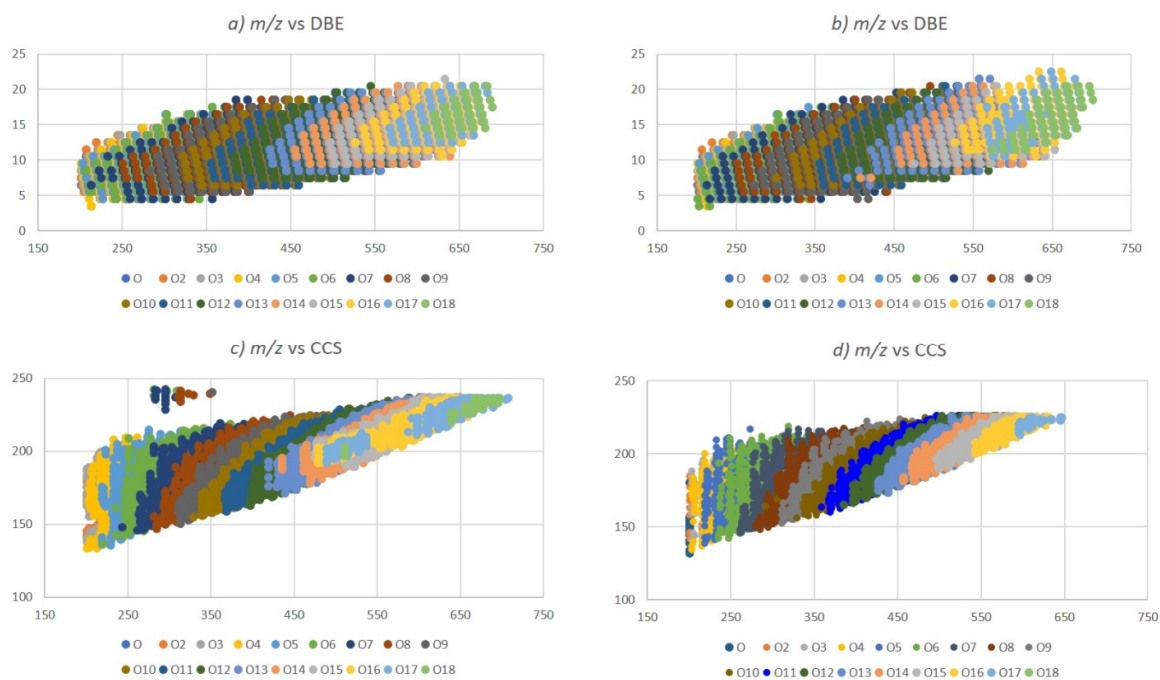


Figura 4.8 Distribuição das classes oxigenadas em função do DBE (a; b) e CCS (c; d) para SRFA usando TIMS-FT-ICR MS (esquerda) e TIMS-TOF MS (direita).

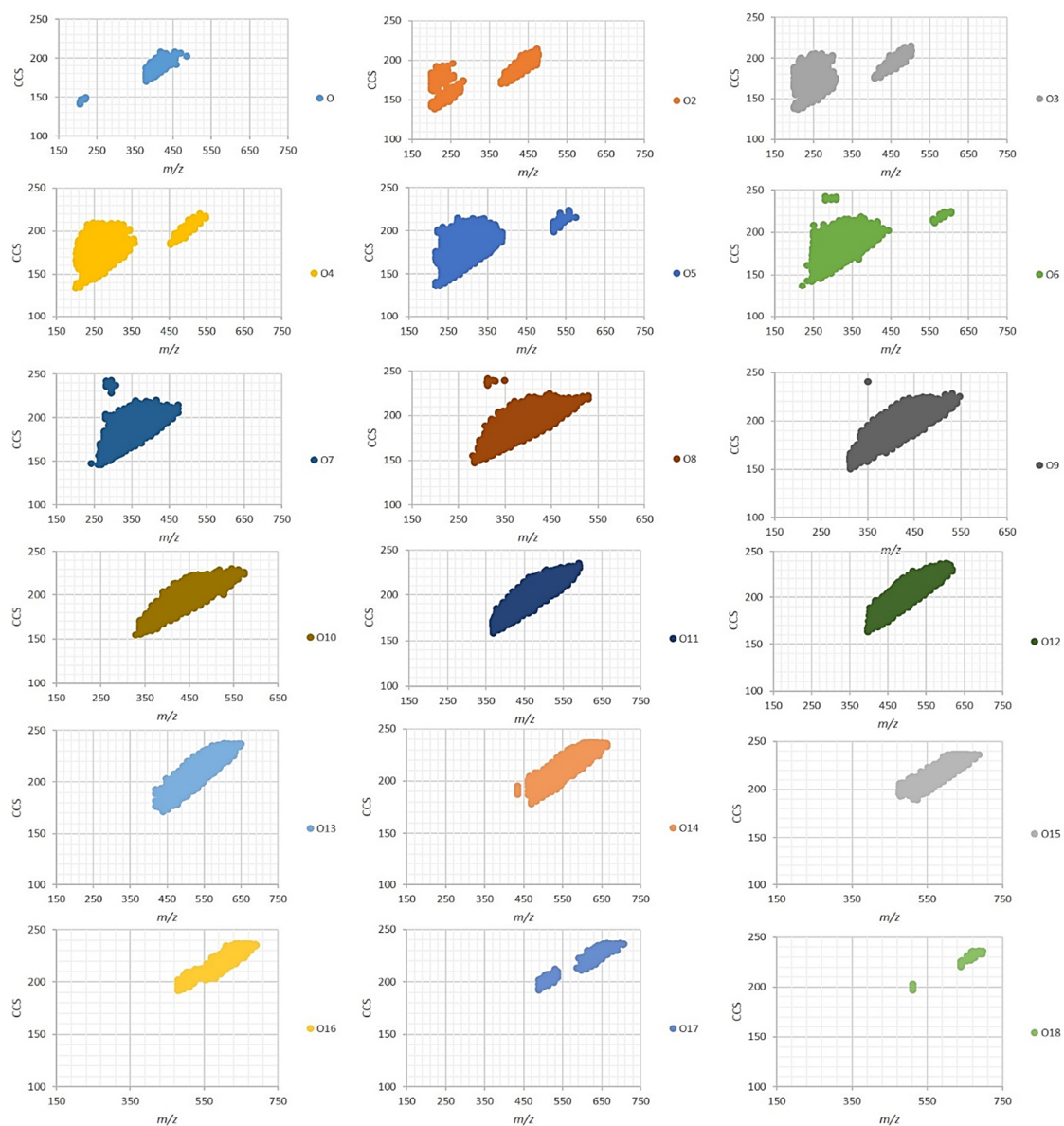


Figura 4.9 Distribuição das classes oxigenadas em função do m/z vs CCS usando TIMS-FT-ICR MS.

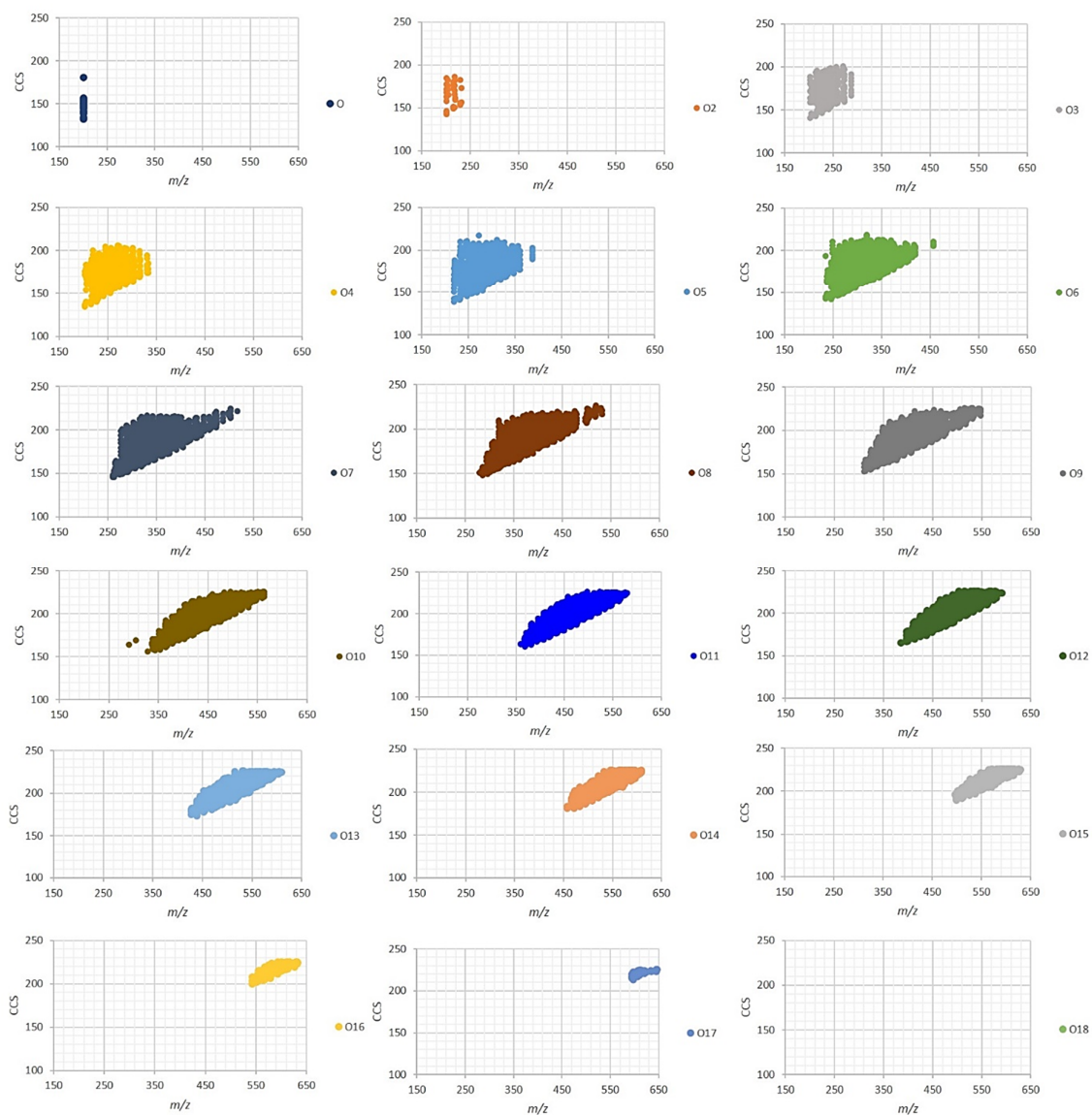


Figura 4.10 Distribuição das classes oxigenadas em função do m/z vs CCS usando TIMS-TOF MS.

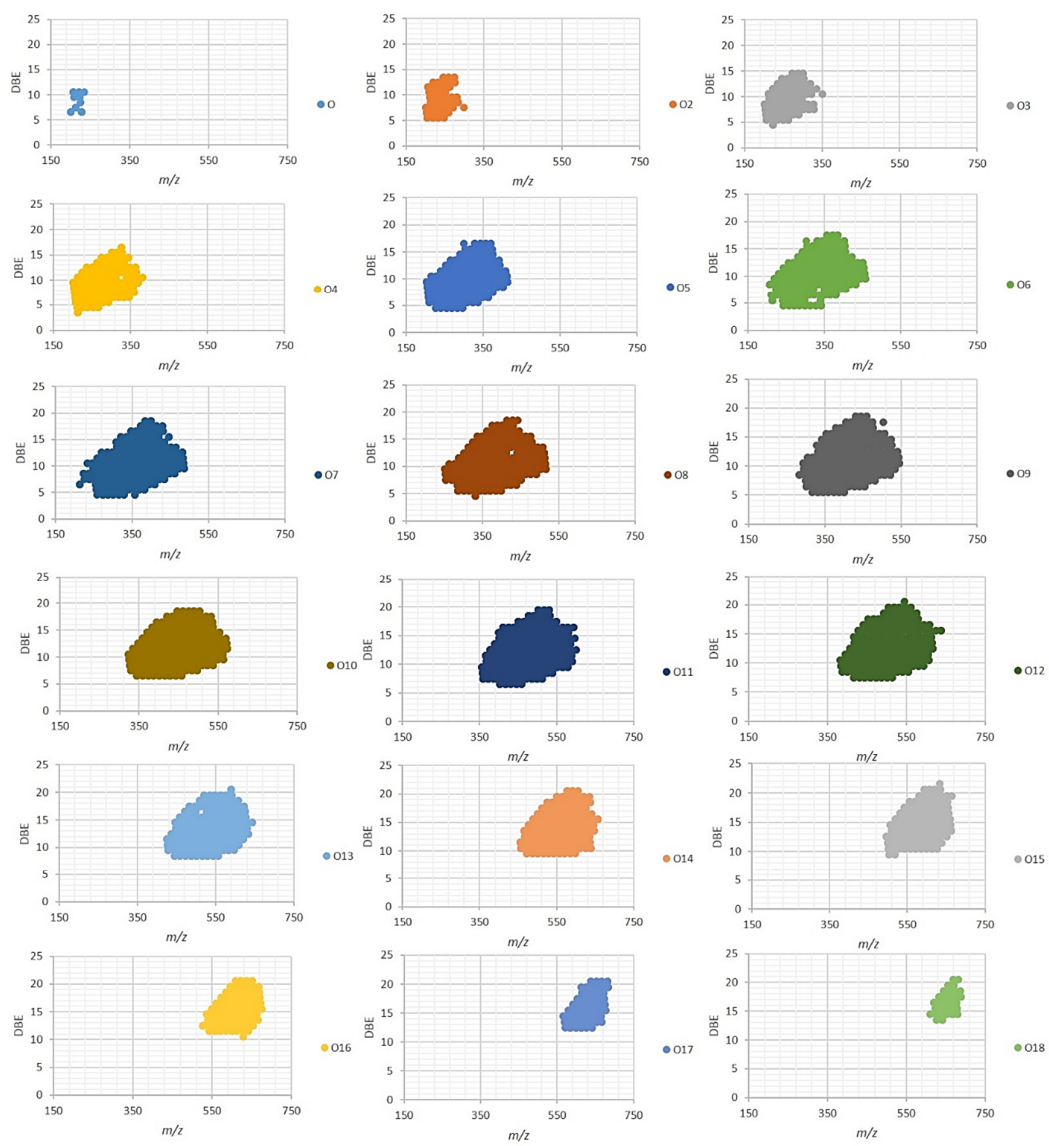


Figura 4.11 Distribuição das classes oxigenadas em função do m/z vs DBE usando TIMS-FT-ICR MS.



Figura 4.12 Distribuição das classes oxigenadas em função do m/z vs DBE usando TIMS-TOF MS.

4.5 CONCLUSÃO

A análise de uma amostra complexa, SRFA, permitiu a avaliação do desempenho do analisador TIMS quando acoplado ao TOF-MS e FT-ICR MS. A comparação entre os analisadores mostrou alta reprodutibilidade da separação por mobilidade, principalmente para compostos de baixa massa molecular. Um poder de resolução para mobilidade iônica ($R > 80$) foi consistentemente observado usando uma taxa de *scan* equivalente a $Sr = 1,8$ V/ms. O uso de padrão externo forneceu alta precisão de massa (< 2 ppm e < 1 ppm para TOF MS e FT-ICR MS, respectivamente) e mobilidade ($< 0,5\%$ de erro). Muitos compostos foram detectados nos gráficos 2D-IMS MS ($\sim 7,6k$ e $\sim 22,3k$ para TOF MS e FT-ICR MS, respectivamente), e o uso de atribuição de fórmula química seguido pelo algoritmo SAME permitindo atribuir, pela primeira vez, uma estimativa do número de isômeros moleculares no padrão SRFA. O uso de padrões complementares para atribuição de características moleculares com base em IMS-MS foi demonstrado usando padrões isoméricos.

Capítulo 5: Análise de Matéria Orgânica Dissolvida de zonas úmidas subtropicais usando espectrometria de mobilidade iônica (*Trapped Ion Mobility*) e FT-ICR MS

5.1 INTRODUÇÃO

A matéria orgânica dissolvida (*dissolved organic matter* - DOM) é uma das principais formas de matéria orgânica dos sistemas aquáticos naturais e um componente crítico do ciclo global do carbono (Stenson, 2003). Através da DOM são fornecidas informações específicas sobre precursores da matéria orgânica (ligninas, taninos, terpenóides, proteínas) e, portanto, seu processo biogeoquímico no ecossistema (Bae, 2010; Witt, 2009). Ácidos fúlvicos são os principais compostos encontrados em DOM oriundos naturalmente do solo e da água. As zonas úmidas, ou terras alagadas, são os ecossistemas mais frágeis e ameaçados devido às atividades humanas na terra e na água (Jaffé, 1993). Esse ambiente rico em diversidade de espécies pode ser encontrado principalmente em três áreas globalmente importantes: Florida Everglades (EUA), Pantanal (Brasil), e Okavango Delta (Botswana - África).

Para a caracterização estrutural do DOM, são reportados na literatura a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) com representativa contribuição na identificação de grupos funcionais, como compostos alifáticos e aromáticos (Hertkorn, 2016). Entretanto, os espectros apenas avaliam o caráter geral da matéria orgânica (Witt, 2009). A técnica de FT-ICR MS tem se destacado devido ao altíssimo poder de resolução, mostrando vantagens em várias pesquisas da área ambiental, biológica e petróleo. O desenvolvimento da técnica TIMS-MS ampliou a capacidade de identificação de moléculas com maior especificidade em matrizes complexa, por exemplo, na petroleômica: petróleo bruto, porfirinas metálicas e emulsões de petróleo (Benigni, 2017). Em comparação as várias técnicas IMS, o *trapped ion mobility spectrometry* (TIMS) tem crescido rapidamente no mercado de vendas (Silveira, 2017). Desenvolvido em 2011 (Fernandez-Lima, 2011), o analisador TIMS provou ser uma alternativa altamente versátil e viável o seu acoplamento a analisadores de MS de alta resolução (por exemplo FT-ICR MS) (Ridgeway, 2016). A integração do analisador TIMS com MS proporciona a separação das classes químicas em linhas de tendência no domínio de m/z por mobilidade (fornecendo valores de $1/K_0$ e CCS), além de maior rapidez, eficiência para análise de misturas complexas e detalhes a nível molecular. No presente trabalho, pela primeira vez a composição isomérica e estrutural de DOM de zonas úmidas subtropicais foram avaliados usando um analisador TIMS acoplado FT-

ICR MS. O alto poder de resolução do analisador TIMS permite a separação de vários isômeros estruturais por fórmula química. A comparação entre as amostras DOM mostrou que o TIMS-FT-ICR MS é sensível para detectar mudanças no número de compostos (isto é, com base na fórmula química) e na composição isomérica.

5.2 OBJETIVOS

Avaliar a composição isomérica e estrutural de DOM de zonas úmidas subtropicais usando um analisador TIMS acoplado ao FT-ICR MS.

5.3 METODOLOGIA

Preparo de amostras

As águas superficiais de zonas úmidas foram coletadas de três diferentes ambientes: Florida Coastal Everglades – Southern Florida, USA (FCE); Okavango Delta - NW Botswana (OKA) e Pantanal (PAN) - SE Brasil, sendo esses os principais ambientes de água doce subtropicais ricos em biodiversidade do mundo (Jaffé, 1993). Duas amostras de cada área foram selecionadas conforme o período pluvial (período longo ou curto), sendo denominadas como: *long-hydroperiod* (-L) e *short-hydroperiod* (-S) para cada área úmida, respectivamente. As amostras de FCE foram coletadas na região do rio Shark Slough (FCE-L), e do Taylor Slough (FCE-S); da planície alagada do OKA (OKA-L; OKA-S) ao longo do rio Boro; e as amostras do PAN foram coletadas no rio Paraguai (PAN-L) e um canal úmido no Parque Nacional do Pantanal (PAN-S).

O padrão de calibração de massas (ESI-L tuning mix G1969-85000) foi comprado da Agilent Technologies (Santa Clara, CA). Oito padrões, propil galato, ácido 2,4,5-trimetoxibenzóico, ácido 2-metoxi-1-naftóico, ácido 3-metoxi-2-naftóico, ácido 4-metoxi-1-naftóico, ácido dicitlohexil acético, ácido pentadecanóico e ácido esteárico comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). SRFA e os padrões foram dissolvidos 50:50 v/v methanol/água até a concentração final de 1 ppm. Todas amostras foram adicionados 5% (v/v) do padrão de calibração Tuning Mix. Todos solvents usados foram grau de pureza LC-MS ou maior, obtido por Fisher Scientific (Pittsburgh, PA).

Fonte ESI

A fonte de ionização por *electrospray* (Apollo II ESI design, Bruker Daltonics, Inc., MA) foi usada para todas as análises no modo negative de ionização. As soluções

das amostras foram introduzidas no nebulizador a um fluxo de 360 $\mu\text{L/h}$. As condições típicas de operação foram: 3000–3500 V de voltagem do capilar; 10 L/min do fluxo do gás de secagem, 1.0 bar da pressão do gás de nebulização, e 180 °C para temperatura do gás de secagem.

Analises por Espectrometria de Mobilidade Iônica (Trapped Ion Mobility Spectrometry)

Os espectros de mobilidade foram calibrados usando um padrão de calibração Tuning Mix (Tunemix, G2421A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) com os seguintes valores de mobilidade (K_0) para os íons m/z 622 $K_0=1.025$, m/z 922 $K_0=0.840$, m/z 1222 $K_0=0.724$, m/z 1522 $K_0=0.643 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. [41, 42]

Analises por TIMS-FT-ICR MS

Os experimentos TIMS-FT-ICR MS foram realizados em um equipamento customizado com um analisador TIMS acoplado ao espectrômetro de massas FT-ICR MS 7T Solarix equipado com uma célula de ICR (Bruker Daltonics Inc., MA). O analisador TIMS é controlado usando um *in-house software*, National Instruments Lab VIEW, que é sincronizado com o programa de aquisição usado pelo FT-ICR MS 7T Solarix. A separação por TIMS foi realizada usando gás nitrogênio a 300 K, $P_1 = 2.2$ e $P_2 = 0.9$ mbar, e RF constante (2200 kHz e 140-160 Vpp). A célula TIMS foi operada usando os parâmetros *fill/trap/elute/quench* correspondentes a 9/3/9/3 ms, usando uma media de 1000 IMS *scans* por espectro de massas e um gradient de diferencial de tensão ΔE de 5.0 V. O gradiente de tensão da rampa ΔV_{ramp} foi -160 a -60, em total de 400 *steps*. O defletor (V_{def}), funil de entrada (V_{fun}), voltagem do analisador ($V_{\text{saída}}$) e uma rampa de voltagem (V_{ramp}) foram $V_{\text{def}} = -180/180\text{V}$, $V_{\text{fun}} = -90\text{V}$, $V_{\text{saída}} = -50 \text{ V}$ e $V_{\text{ramp}} = -80\text{V}/80\text{V}$. Os espectros por TIMS-FT-ICR MS atingiram um poder de resolução de $R \sim 400,000$ para m/z 400.

Processamento de dados

Os espectros de TIMS-TOF MS e TIMS-FT-ICR MS foram externamente calibrados por massas e mobilidade usando o padrão de calibração Agilent ESI-L. As formulas moleculares foram calculadas usando o *software* Composer (Versão 1.0.6, Sierra Analytics, CA) e confirmado com DataAnalysis (Bruker Daltonics v 4.2) usando a formula mínima $\text{C}_x\text{H}_y\text{N}_{0-3}\text{O}_{0-19}\text{S}_{0-1}$. Das fórmulas de íons geradas, a *double bond equivalence* (DBE) foi calculada pela equação:

$$DBE = C - \frac{H}{2} + \frac{N}{2} + 1 \quad (3)$$

onde C, H e N são os números de carbonos, hidrogênio e nitrogênio na fórmula química.

Por meio do *software* Data Analysis (Version v. 5.1, Bruker Daltonics, CA), os dados dos espectros de mobilidade iônica foram externamente calibrados e extraídos a partir dos dados brutos do TIMS-MS. Os espectros TIMS para cada fórmula molecular foi processado usando um *software* customizado SAME (Software Assisted Molecular Elucidation), especificamente construído para o processamento de dados 2D TIMS-MS.^[44] O *software* SAME trata-se de uma rotina construída no Python v2.7, onde as informações finais são em termos de [*m/z*; chemical formula; K; CCS] para cada dado TIMS-MS. Os gráficos de contorno 2D TIMS-MS foram gerados no DataAnalysis (Version v. 5.1, Bruker Daltonics, CA) e os outros gráficos foram gerados usando o OriginPro 2016 (Originlab Co., MA).

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises de DOM usando TIMS acoplado ao FT-ICR MS resulta em uma única linha de tendência no domínio IMS-MS, composta por espécies monocarregadas (Figura 5.1). Pela distribuição MS das amostras observa-se uma distribuição gaussiana centralizada em torno de *m/z* 400, independentemente da amostra. Uma inspeção mais minuciosa dos espectros de massa de FT-ICR MS permitiu a identificação de um grande número de compostos: a) OKA-L: 4140; b) OKA-S: 4805; c) PAN-L: 5004; d) PAN-S: 4660; e) FCE-L: 4145; f) FCE-S: 5370. O processamento dos dados por TIMS-FT-ICR MS usando o algoritmo SAME levou a observação de uma ampla variedade de compostos: a) OKA-L: 19140; b) OKA-S: 21700; c) PAN-L: 22015; d) PAN-S: 20954; e) FCE-L: 19500; f) FCE-S: 22350. Os resultados foram obtidos em termos de *m/z*, chemical formula, K e CCS, no qual o processamento usando o algoritmo SAME levou à observação de que o número de compostos por mobilidade é maior que o número de sinais e fórmulas químicas, conforme observado na Figura 5.1. Assumindo a fórmula mínima $C_xH_yN_{0-3}O_{0-19}S_{0-1}$, foram atribuídas as fórmulas químicas a partir dos sinais por FT-ICR MS: a) OKA-L: 3400; b) OKA-S: 2998; c) PAN-L: 3066; d) PAN-S: 2830; e) FCE-L: 2815; f) FCE-S: 3165; onde mais de 80% dos compostos identificados correspondem a compostos altamente oxigenados (O_1 - O_{20}), o que está em concordância com a Figura 5.2 (Stubbins, 2010), em que facilmente nota-se a diferença dos dados

TIMS-MS com os MS. Além dos compostos oxigenados, a distribuição de classes mostrou, em menor número, compostos nitrogenados e sulfurados.

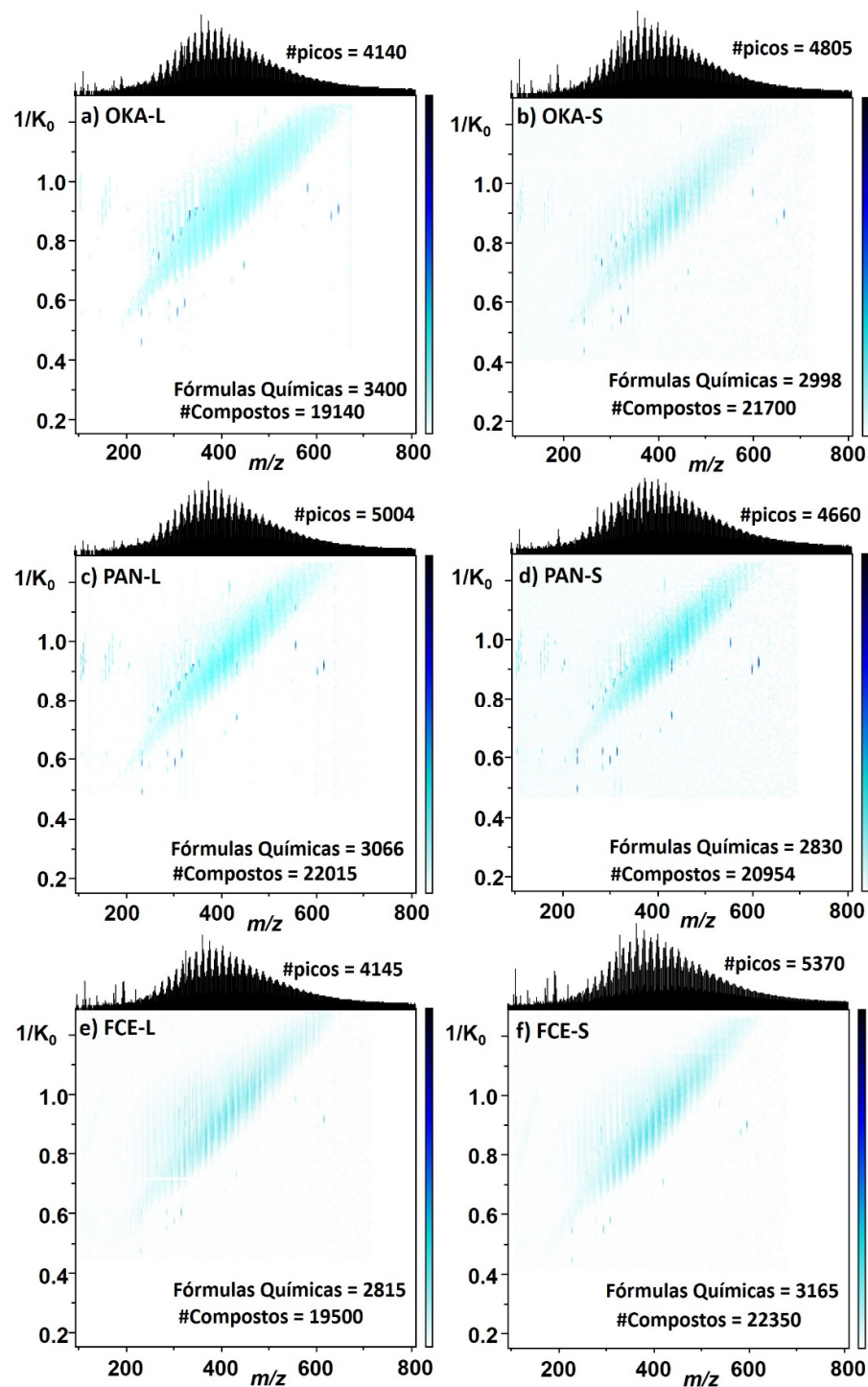


Figura 5.1 Gráficos de contorno 2D-TIMS MS e espectros MS para amostras de DOM obtidos por TIMS-FT-ICR MS: OKA-L; PAN-L; FCE-L (esquerda); e OKA-S; PAN-S; FCE-S (direita).

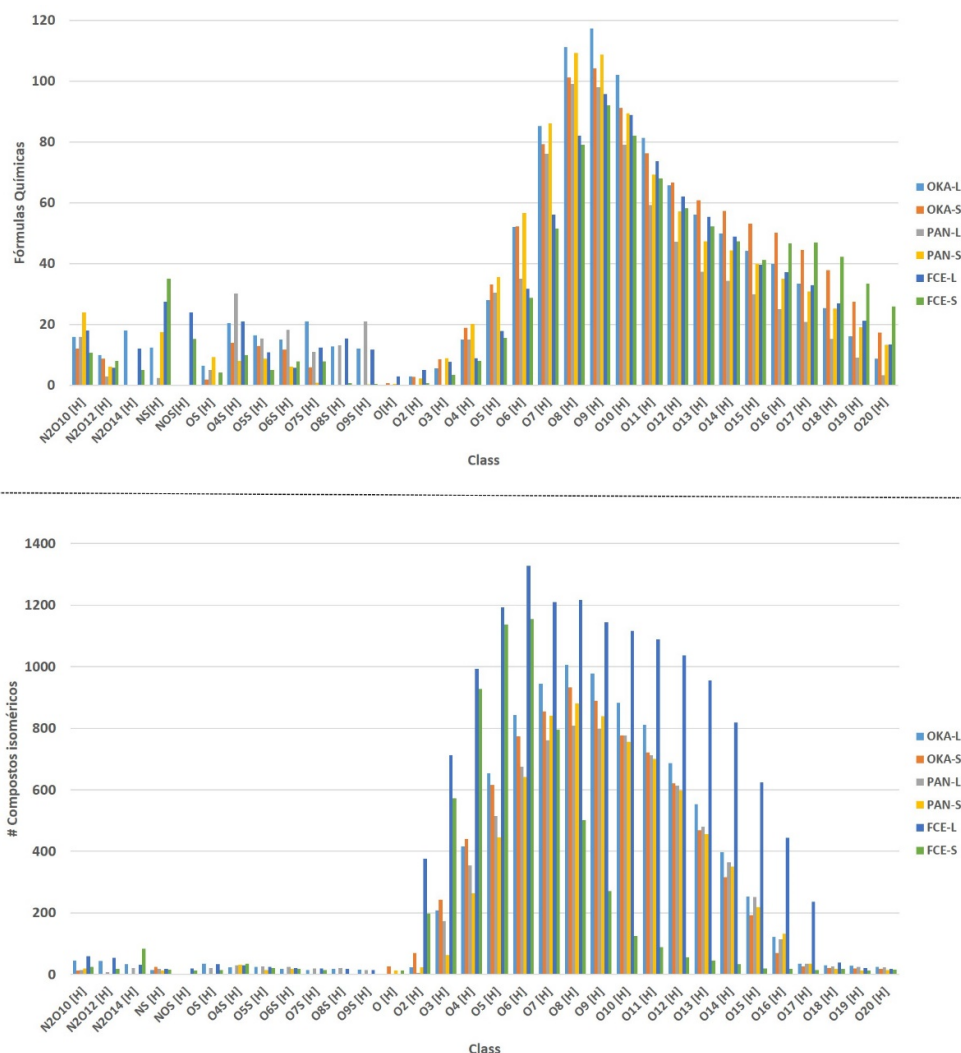


Figura 5.2 Gráfico de distribuição de classes (a) Fórmula Química; (b) Número de compostos por mobilidade.

Através dos dados do TIMS-FT-ICR MS foram feitas projeções individuais para cada amostra (Figura 5.3), na qual comparou-se o número de compostos únicos e comuns entre cada par de amostras no domínio do inverso da mobilidade ($1/K_0$) e de m/z . OKA-S, PAN-L e FCE-S apresentaram maior abundância de sinais (3010; 2750; 3115; respectivamente) e compostos únicos por mobilidade (11284; 12108; 11500; respectivamente), Figura 5.3b, 5.3d e 5.3h; à direita foram identificados compostos comuns nos pares de DOM, onde o número de sinais e o número de compostos em comum por mobilidade são maiores na Figura 5.3i (compostos comuns de FCE).

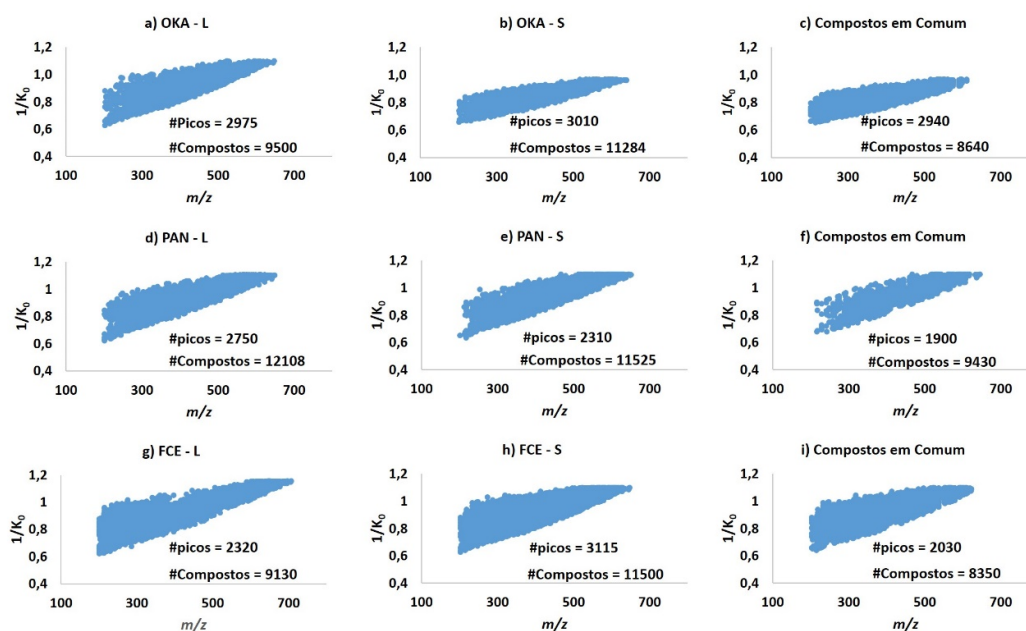


Figura 5.3 Projeções individuais por TIMS-FT-ICR MS para cada amostra: OKA-L, PAN-L, FCE-L (esquerda); OKA-S, PAN-S, FCE-S (meio); compostos em comum entre os pares de amostras (direita).

Utilizando os diagramas de Van Krevelen podem ser extraídos das análises por FT-ICR MS os valores das razões molares de H/C e O/C (Figura 5.4), onde são identificados os compostos saturados (por exemplo, lipídios e peptídeos), compostos alicíclicos ricos em carboxila (por exemplo, ligninas e taninos), carbonil compostos cíclicos (carboidratos), hidrocarbonetos insaturados e regiões de hidrocarbonetos condensados (Wang, 2016). As principais diferenças entre as amostras de *long-hydroperiod* (-L) e *short-hydroperiod* (-S) estão na degradação do saturado (OKA-S e PAN-S); degradação de hidrocarbonetos insaturados (FCE-S); o aumento da intensidade dos compostos alicíclicos ricos em carboxila (OKA-S; PAN-S; FCE-S); FCE (-L e -S) com maior abundância de carboidratos em relação as outras amostras.

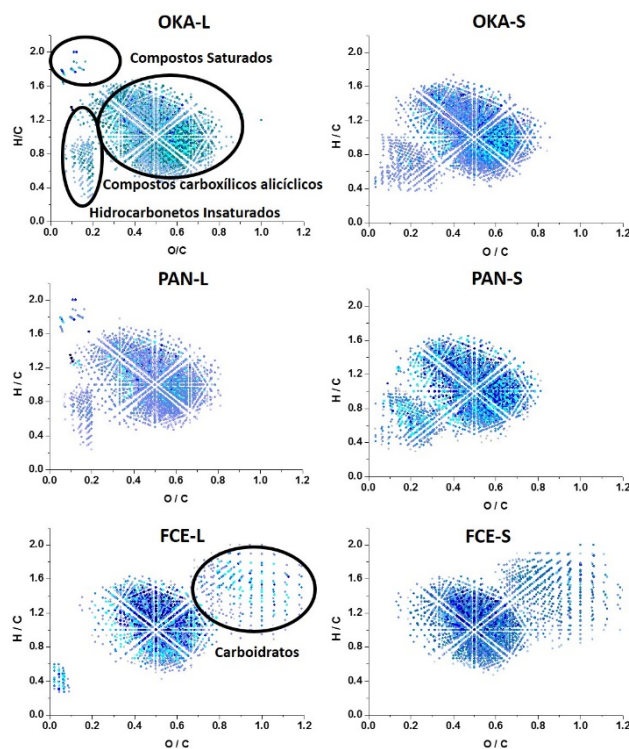


Figura 5.4 Gráficos de Van Krevelen obtidos das análises de DOM usando TIMS-FT-ICR MS.

A distribuição das classes de heteroátomos em função do DBE ou CCS para misturas complexas pode fornecer informações adicionais sobre a diversidade estrutural no DOM. Como tendência geral, à medida que o m/z aumenta, os compostos heteroatomicos com maior teor de oxigênio são observados. Isso é facilmente observado na Figura 5.5, onde as moléculas menores têm baixo número de compostos de oxigênio, DBE de 3 a 15 e CCS de 140 a 220 Å², enquanto moléculas maiores são altamente oxigenadas, DBE de 7 a 20 e CCS de 200 a 225 Å², onde PAN e FCE apresentam CCS por volta de 240 Å² (Figura 5.6). Além disso, são observadas grandes distribuições nos domínios DBE e CCS, independentemente do número de oxigênio (ver detalhes nas Figuras 5.11 a 5.22 em Anexo).

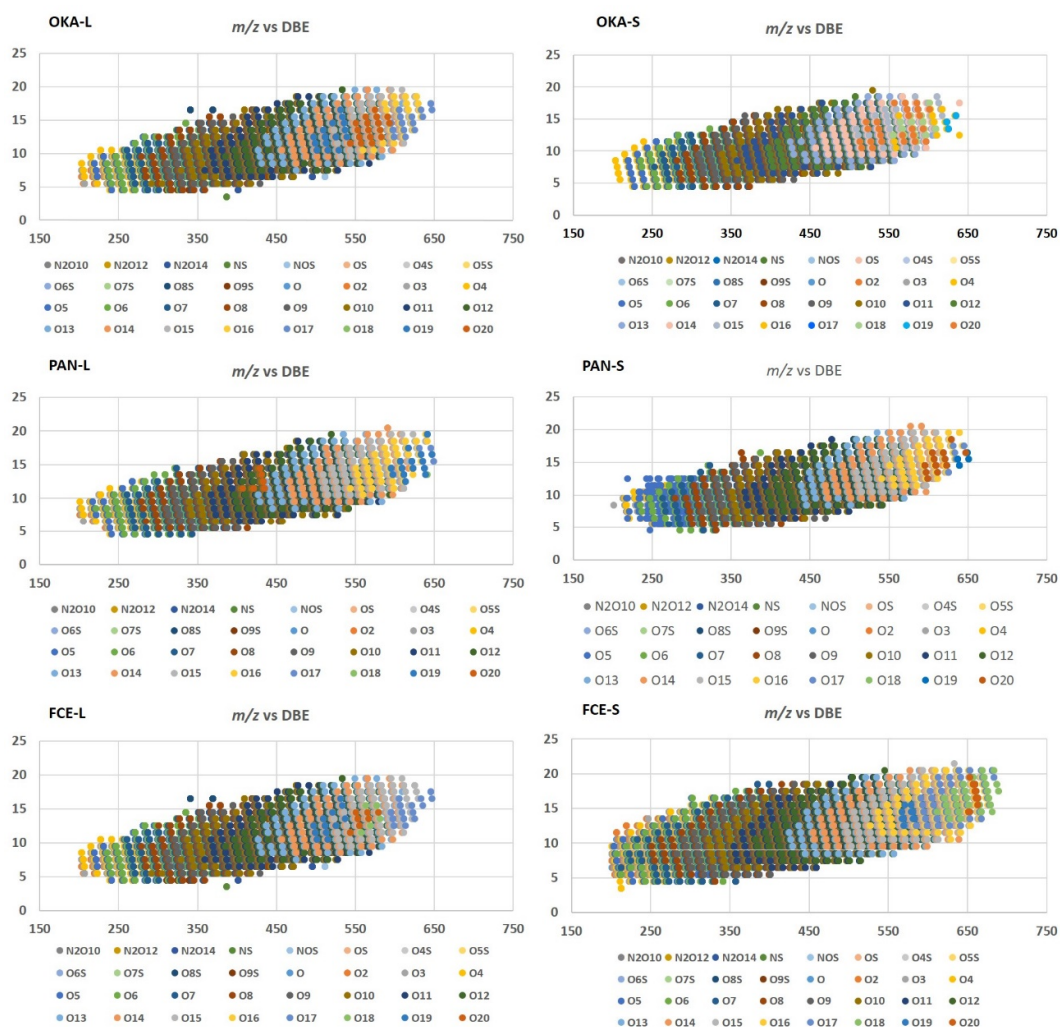


Figura 5.5 Distribuição de compostos heteroatômicos para análises de DOM em função do DBE.

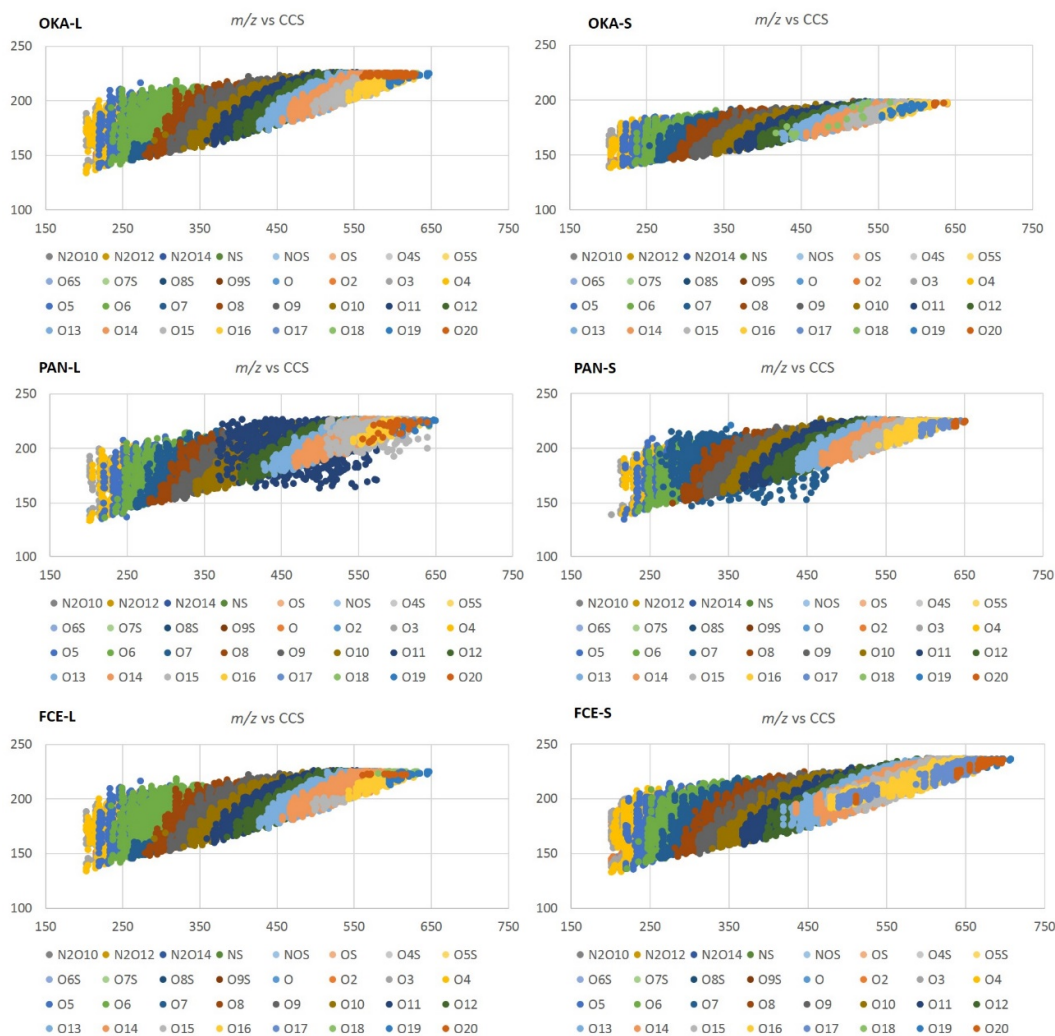


Figura 5.6. Distribuição dos compostos heteroatômicos para análises de DOM em função do CCS.

A diversidade estrutural do DOM e o desempenho do analisador TIMS-MS é ilustrada nas Figuras 5.8; 5.9 e 5.10, onde os valores são comparados com compostos padrões (Figura 5.7). Por exemplo, em m/z 201, o FT-ICR MS ($R \sim 350k$) detectou seis sinais de m/z distintos (Tabela 5.1), e o algoritmo SAME atribuiu as bandas IMS à existência de, pelo menos, 4 a 8 isômeros estruturais por fórmula química. A análise dos padrões de ácido 2-metoxi-1-naftóico, ácido 3-metoxi-2-naftóico e do ácido 4-metoxi-1-naftóico mostram uma única banda IMS para os íons $[M-H]^-$, $([C_{12}H_9O_3]^-)$, com CCS muito similar ($<2 \text{ \AA}^2$), que podem ser correlacionados com a maior banda IMS observada o íon $[C_{12}H_9O_3]^-$ em todas as amostras de DOM. Ou seja, os resultados sugerem que as amostras de DOM contêm ao menos um desses padrões e que vários

isômeros podem não estar totalmente resolvidos. No m/z 211, o FT-ICR MS ($R \sim 250k$) detectou seis sinais de m/z distintos (Tabela 5.2), e o algoritmo SAME atribuiu as bandas IMS existência de ao menos 4-8 isômeros estruturais por fórmula química. A análise dos padrões de ácido 2,4,5-trimetoxibenzóico e propil galato mostrou uma única banda IMS para os íons $[M-H]^-$, com CCS muito distintos ($\sim 20 \text{ \AA}^2$ de diferença), onde o CCS do galato de propila e do ácido 2,4,5-trimetoxibenzóico coincide com a banda para os íons em DOM $[C_{10}H_{11}O_5]^-$. Esses resultados sugerem que a amostra do DOM provavelmente contém ambos os compostos.

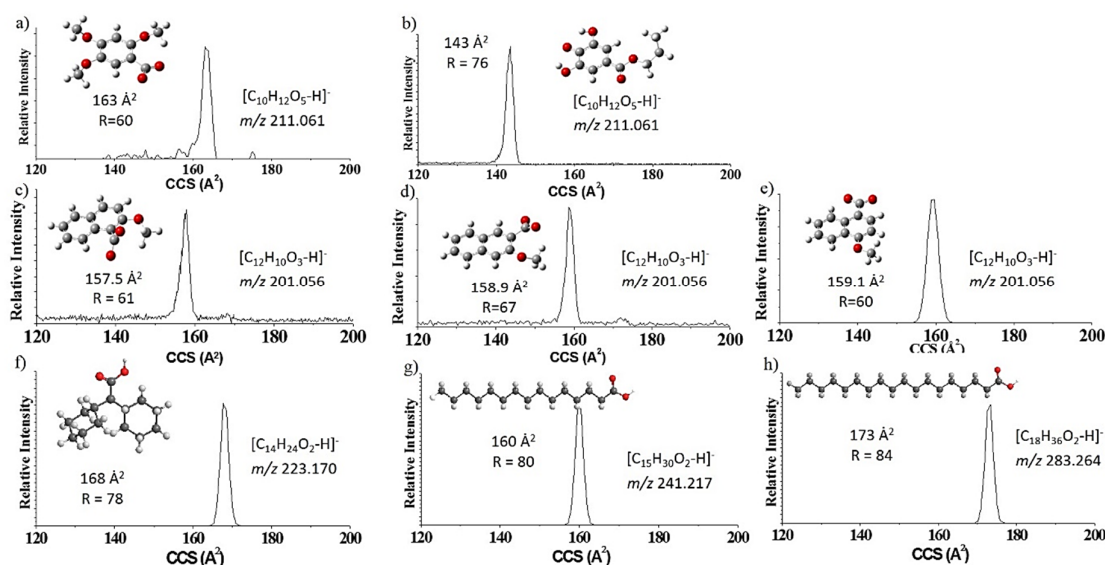


Figura 5.7. Perfis de mobilidade para os padrões: ácido 2,4,5-trimetoxibenzóico (a); propil galato (b); ácido 2-metoxi-1-naftóico (c); ácido 3-metoxi-2-naftóico (d); ácido 4-metoxi-1-naftóico (e); ácido dicitclohexil acético (f); ácido pentadecanóico (g); e ácido esteárico (h).

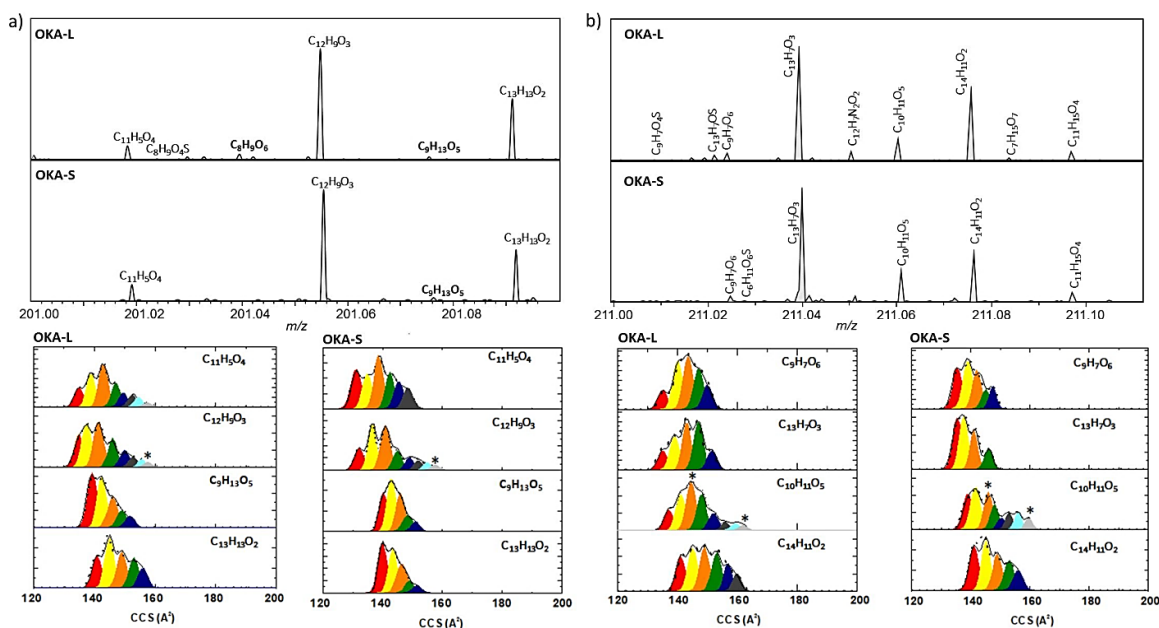


Figura 5.8 Espectros por MS e IMS para as análises de OKA-L e OKA-S para os íons (a) m/z 201; (b) m/z 211. * Padrões projetados: a) ácido 2-metoxi-1-naftóico ($157,5 \text{ \AA}^2$); ácido 3-metoxi-2-naftóico ($158,9 \text{ \AA}^2$) e ácido 4-metoxi-1-naftóico ($159,1 \text{ \AA}^2$), para o íon $[\text{C}_{12}\text{H}_9\text{O}_3]^-$; *Observe a sobreposição dos padrões com no segundo e o última sinais de mobilidade $[\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_5]^-$ em b) propil galato (143 \AA^2); ácido 2,4,5-trimetoxibenzóico (163 \AA^2).

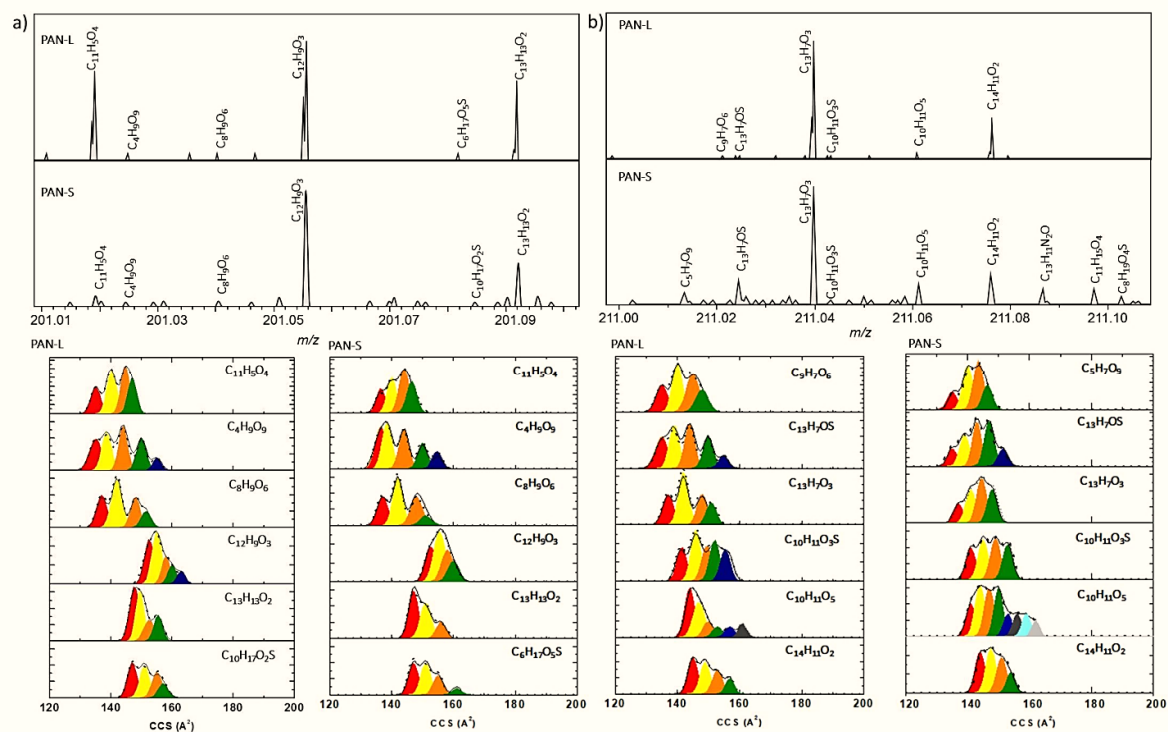


Figura 5.9 Espectros por MS e IMS para as análises de PAN-L e PAN-S para os íons (a) m/z 201; (b) m/z 211. * Padrões projetados: a) ácido 2-metoxi-1-naftóico ($157,5 \text{ \AA}^2$); ácido 3-metoxi-2-naftóico ($158,9 \text{ \AA}^2$) e ácido 4-metoxi-1-naftóico ($159,1 \text{ \AA}^2$), para o íon $[\text{C}_{12}\text{H}_9\text{O}_3]^-$; *Observe a sobreposição dos padrões com no segundo e o última sinais de mobilidade $[\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_5]^-$ em b) propil galato (143 \AA^2); ácido 2,4,5-trimetoxibenzóico (163 \AA^2).

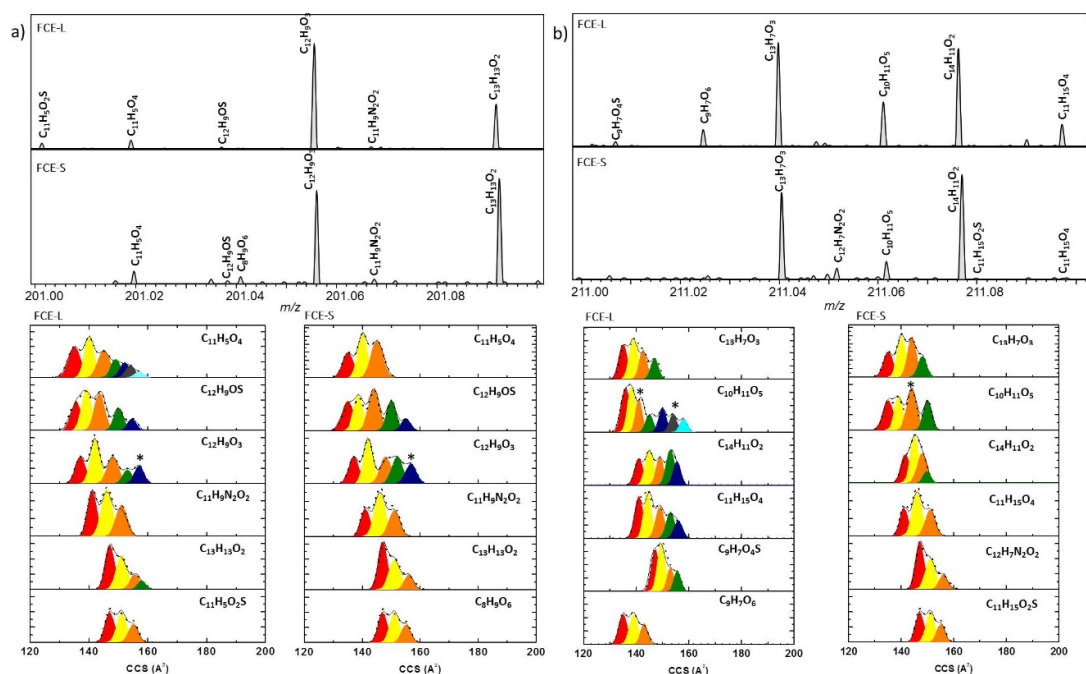


Figura 5.10 Espectros por MS e IMS para as análises de FCE-L e FCE-S para os íons (a) m/z 201; (b) m/z 211. * Padrões projetados: a) ácido 2-metoxi-1-naftóico ($157,5 \text{ \AA}^2$); ácido 3-metoxi-2-naftóico ($158,9 \text{ \AA}^2$) e ácido 4-metoxi-1-naftóico ($159,1 \text{ \AA}^2$), para o íon $[\text{C}_{12}\text{H}_9\text{O}_3]^-$; *Observe a sobreposição dos padrões com no segundo e o última sinais de mobilidade $[\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_5]^-$ em b) propil galato (143 \AA^2); ácido 2,4,5-trimetoxibenzóico (163 \AA^2).

Tabela 5.1 Fórmulas Químicas e valores de CCS em m/z 201

m/z	Fórmula Química	CCS	OKA-L	OKA-S	PAN-L	PAN-S	FCE-L	FCE-S
201.01933	$C_{11}H_5O_4$	131	-	✓	-	-	-	-
		135	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		139	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		143	✓	✓	-	-	-	-
		145	-	✓	✓	✓	✓	✓
		147	✓	-	✓	✓	-	-
		149	✓	✓	-	-	✓	-
		152	✓	-	-	-	✓	-
		154	✓	-	-	-	✓	-
		157	✓	-	-	-	✓	-
201.05572	$C_{12}H_9O_3$	132	-	✓	✓	✓	-	-
		135	✓	-	✓	✓	-	-
		137	-	✓	-	-	✓	✓
		138	✓	-	✓	✓	-	-
		141	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		143	-	-	✓	-	-	-
		146	✓	✓	-	-	✓	✓
		150	✓	✓	-	-	-	-
		153	✓	✓	-	-	✓	-
		*157	✓	✓	✓	✓	✓	✓
201.07685	$C_9H_{13}O_5$	140	✓	✓	-	-	-	-
		143	✓	✓	-	-	-	-
		146	✓	✓	-	-	-	-
		149	✓	✓	-	-	-	-
		152	✓	✓	-	-	-	-
201.09210	$C_{13}H_{13}O_2$	141	✓	✓	-	-	-	-
		145	✓	✓	-	-	-	-
		147	-	✓	✓	✓	✓	✓
		149	✓	✓	✓	-	✓	-
		153	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		156	✓	-	✓	✓	✓	✓
201.02270	$C_8H_9O_4S$	147	✓	-	-	-	-	-
		150	✓	-	-	-	-	-
		152	✓	-	-	-	-	-
		154	✓	-	-	-	-	-
201.04046	$C_8H_9O_6$	137	✓	-	✓	✓	-	-
		142	✓	-	✓	✓	-	-
		148	✓	-	✓	✓	-	✓
		151	✓	-	✓	✓	-	✓
		154	-	-	-	-	-	✓
201.02521	$C_4H_9O_9$	135	-	-	✓	✓	-	-
		139	-	-	✓	✓	-	-
		144	-	-	✓	✓	-	-
		150	-	-	✓	✓	-	-
		155	-	-	✓	✓	-	-
201.09548	$C_{10}H_{17}O_2S$	147	-	-	✓	-	✓	-

		151	-	-	✓	-	✓	-
		155	-	-	✓	-	✓	-
		157	-	-	✓	-	-	-
201.08022	C ₆ H ₁₇ O ₅ S	146	-	-	-	✓	-	-
		151	-	-	-	✓	-	-
		155	-	-	-	✓	-	-
		161	-	-	-	✓	-	-
201.03796	C ₁₂ H ₉ OS	136	-	-	-	-	✓	✓
		139	-	-	-	-	✓	✓
		144	-	-	-	-	✓	✓
		150	-	-	-	-	✓	✓
		154	-	-	-	-	✓	✓
201.06695	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O ₂	141	-	-	-	-	✓	✓
		146	-	-	-	-	✓	✓
		151	-	-	-	-	✓	✓

*Ácido 2-metoxi-1-naftóico (157.5 Å²); ácido 3-metoxi-2-naftóico (158.9 Å²) e ácido 4-metoxi-1-naftóico (159.1 Å²)

Tabela 5.2 Fórmulas Químicas e valores de CCS em m/z 211

<i>m/z</i>	Fórmula Química	CCS	OKA-L	OKA-S	PAN-L	PAN-S	FCE-L	FCE-S
211.02481	C ₉ H ₇ O ₆	135	✓	✓	✓	-	-	-
		140	✓	✓	✓	-	✓	-
		144	✓	✓	✓	-	✓	-
		147	✓	✓	✓	-	-	-
		150	✓	✓	-	-	✓	-
211.04007	C ₁₃ H ₇ O ₃	135	✓	✓	-	-	✓	✓
		139	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		143	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		147	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		151	✓	-	✓	✓	-	-
211.06120	C ₁₀ H ₁₁ O ₅	137	✓	✓	✓	-	✓	✓
		141	✓	✓	✓	✓	✓	✓
*Propil galato		143	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		148	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		152	✓	✓	-	-	-	-
*Ácido 2,4,5- trimetoxibenzóico		163	✓	✓	✓	✓	✓	-
211.07645	C ₁₄ H ₁₁ O ₂	141	✓	✓	-	-	✓	✓
		145	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		149	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		153	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		157	✓	✓	✓	✓	✓	-
		160	✓	-	-	-	-	-
211.09758	C ₁₁ H ₁₅ O ₄	141	✓	-	-	-	✓	✓
		145	✓	✓	-	✓	✓	✓
		149	✓	✓	-	✓	✓	✓
		153	✓	✓	-	✓	✓	-
		157	✓	✓	-	✓	✓	-
		160	✓	-	-	-	-	-
211.00705	C ₉ H ₇ O ₄ S	144	✓	-	-	-	-	-
		147	✓	-	-	-	✓	-
		151	✓	-	-	-	✓	-
		154	✓	-	-	-	✓	-
		157	✓	-	-	-	✓	-
211.02818	C ₆ H ₁₁ O ₆ S	147	✓	-	-	-	-	-
		150	✓	-	-	-	-	-
		154	✓	-	-	-	-	-
211.05130	C ₁₂ H ₇ N ₂ O ₂	147	✓	-	-	-	-	✓
		150	✓	-	-	-	-	✓
		154	✓	-	-	-	-	-
		157	✓	-	-	-	-	✓
211.08233	C ₇ H ₁₅ O ₇	145	✓	-	-	-	-	-
		148	✓	-	-	-	-	-
		151	✓	-	-	-	-	-
		153	✓	-	-	-	-	-
211.02231	C ₁₃ H ₇ OS	135	-	-	✓	✓	-	-
		139	-	-	✓	✓	-	-

		144	✓	-	✓	✓	-	-
		147	✓	-	✓	✓	-	-
		150	✓	-	✓	✓	-	-
		155	✓	-	✓	✓	-	-
211.08769	C ₁₃ H ₁₁ N ₂ O	145	-	-	-	✓	-	-
		149	-	-	-	✓	-	-
		152	-	-	-	✓	-	-
		156	-	-	-	✓	-	-
211.10095	C ₈ H ₁₉ O ₄ S	148	-	-	-	✓	-	-
		151	-	-	-	✓	-	-
		154	-	-	-	✓	-	-
		158	-	-	-	✓	-	-
211.07982	C ₁₁ H ₁₅ O ₂ S	147	-	-	-	-	-	✓
		151	-	-	-	-	-	✓
		155	-	-	-	-	-	✓

Adicionalmente, outros padrões ácidos com diferentes valores de m/z foram encontrados nas amostras de DOM, os quais são ácido diciclohexil acético (m/z 223; 168 Å²; [C₁₄H₂₄O₂-H]⁻), ácido pentadecanóico (m/z 241; 160 Å²; [C₁₅H₃₀O₂-H]⁻), ácido esteárico (m/z 283; 173 Å²; [C₁₈H₃₆O₂-H]⁻), descritos na tabela 5.3, 5.4 e 5.5. OKA-S, PAN-S e FCE-S tiveram valores de CCS de 168 Å² (padrão ácido diciclohexil acético); todas as amostras tiveram valores de CCS correlacionados ao ácido pentadecanóico; OKA-L, PAN-L e FCE-L foram correlacionados ao ácido esteárico com valores de CCS por volta de 173 Å².

Tabela 5.3 Fórmulas Químicas e valores de CCS em m/z 223

m/z	Fórmula Química	CCS	OKA-L	OKA-S	PAN-L	PAN-S	FCE-L	FCE-S
223.13397	$C_{13}H_{19}O_3$	144	-	-	-	-	-	✓
		147	✓	-	-	-	-	✓
		151	-	-	-	-	✓	✓
		155	-	✓	-	-	✓	✓
		157	-	✓	-	✓	✓	-
		160	✓	✓	✓	✓	✓	-
		164	✓	-	✓	✓	✓	-
		166	-	✓	✓	-	-	-
		169	✓	-	-	-	✓	-
		173	✓	✓	-	✓	-	-
		176	✓	✓	✓	✓	✓	-
		178	-	✓	✓	✓	✓	-
		180	✓	-	✓	-	-	-
		183	✓	-	✓	-	-	-
223.17035	$C_{14}H_{23}O_2$	151	-	✓	✓	-	-	✓
		156	-	✓	✓	-	-	✓
		159	-	✓	✓	✓	-	✓
		161	-	✓	✓	✓	✓	✓
		163	-	✓	✓	✓	✓	✓
		165	-	✓	-	✓	✓	✓
		168	-	✓	-	✓	-	✓
		171	-	-	-	-	-	✓
		175	-	-	-	-	-	✓
		178	-	-	-	-	-	✓

*Ácido dicitclohexil
acético

Tabela 5.4 Fórmulas Químicas e valores de CCS em m/z 241

m/z	Fórmula Química	CCS	OKA-L	OKA-S	PAN-L	PAN-S	FCE-L	FCE-S
241.217304	$C_{15}H_{29}O_2$	147	-	✓	-	✓	-	✓
		149	-	✓	-	-	-	-
		151	✓	-	-	✓	✓	✓
		155	✓	✓	-	-	✓	✓
		157	-	-	-	-	✓	✓
		160	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		164	✓	✓	✓	-	✓	✓
		166	-	✓	✓	-	-	✓
		169	-	-	-	-	✓	-
		170	✓	-	-	✓	-	-
		174	-	-	✓	✓	✓	-
		178	✓	✓	✓	✓	✓	-
		180	-	✓	✓	-	✓	-
		184	✓	-	✓	✓	-	-
		187	✓	-	-	✓	-	-
		190	✓	-	✓	-	-	-
		193	✓	-	✓	-	-	-

Tabela 5.5 Fórmulas Químicas e valores de CCS em m/z 283

m/z	Fórmula Química	CCS	OKA-L	OKA-S	PAN-L	PAN-S	FCE-L	FCE-S
283.26425	$C_{18}H_{35}O_2$	147	-	✓	-	-	-	-
		150	-	-	-	-	✓	✓
		152	✓	✓	-	✓	✓	✓
		156	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		162	✓	-	✓	-	-	✓
		164	-	✓	-	-	✓	✓
		166	✓	✓	-	✓	-	-
		169	-	-	✓	✓	✓	✓
		173	✓	-	✓	-	✓	-
		177	✓	-	✓	-	✓	-

5.5 CONCLUSÃO

Pela primeira vez, a técnica de TIMS-FT-ICR MS permitiu realizar análise de amostras de DOM com respeito ao conteúdo isomérico e estrutural. A comparação entre as amostras *long-hydroperiod* (-L) e *short-hydroperiod* (-S) mostrou que o TIMS-FT-ICR MS é sensível para detectar alterações no número de compostos (isto é, com base na fórmula química) e mudanças na composição estrutural por massa nominal, bem como mudanças na abundância relativa de isômeros estruturais. Uma ampla variedade de compostos foi detectada nos gráficos 2D-IMS-MS (~ 25,5k para FT-ICR MS), e o uso do algoritmo SAME para atribuição de fórmulas químicas, seguido pelo processamento dos perfis de mobilidade e o emprego de compostos padrões permitiu, pela primeira vez, uma melhor estimativa do número de isômeros moleculares em DOM.

6 CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho, o perfil químico de matrizes complexas (petróleo, parafinas, compostos aromáticos condensados, matéria orgânica dissolvida) foram investigados. A técnica de ionização ambiente por *atmospheric solids analysis probe mass spectrometry* (ASAP-MS) mostrou-se uma ferramenta poderosa para caracterização de amostras em sua forma original. ASAP(+)-MS ionizou o óleo bruto e a parafina, mostrando um perfil de petróleo típico para ambas amostras, onde o desempenho quanto à detecção de compostos de alto peso molecular (> 1000 Da), foi superior ao de outras fontes de ionização tradicionais, como ESI, APCI, DART e DESI. Em relação aos padrões de AC, foram identificados em ambas as formas: radicais, $[M]^{+\bullet}$ e cátions protonados, $[M+H]^+$, com mínima fragmentação.

Quanto as análises da planta *Cannabis sativa* L. por UPLC-TOF MS e TWIMS-MS foram identificadas a presença de uma mistura isomérica complexa dos canabinóides, principalmente Δ^9 -THC, canabidiol (CBN- C_5 e $M_w = 310$ Da), ácido Δ^9 -tetrahydrocannabinólico A e B (Δ^9 -THCA- C_5 A/B e $M_w = 358$ Da) e seus isômeros. Foram identificados três isômeros, m/z 315/313, 311, and 357 usando infusão direta por ESI-TWIMS MS, enquanto uma alta seletividade foi observada nos dados por UPLC-ESI-TOF-MS, com separação isomérica de quatro a cinco compostos obtidos no modo único de aquisição de íons (SIM).

Ao avaliarmos o uso de um analisador de mobilidade de alta resolução com acoplado a espectrometria de massa de ultra-alta resolução verificamos que, o analisador TIMS acoplado ao TOF MS e FT-ICR MS apresentaram desempenho semelhante e alta reprodutibilidade. Para a análise de misturas complexas, ambos analisadores foram capazes de capturar as principais características. No entanto, à medida que a complexidade química aumenta a nível da massa nominal ($m/z > 300$ -350), apenas o TIMS-FT-ICR MS foi capaz de resolver os compostos de menor abundância.

7 REFERÊNCIAS

- Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. *Spectrometric identification of Organic Compounds*. 7. ed., John Wiley & Sons Ed., Danvers, 13 p., 2005.
- Takats, Z.; Wiseman, J. M.; Cooks, R. G. *Jour. of Mass Spectrom*, v. 40, n. 10, p. 1261-1275, 2011.
- Ahonen, L., Fasciotti, M., Eberlin, M., & Kostianen, R. *Jour. of Chromat. A*, v. 1310, p. 133-137, 2013.
- Hoffmann, E.; Charette, J.; Stroobant, V. *Mass spectrometry - Principles and applications*, 2000.
- Alberici, R. M.; Simas, R. C.; Savido, G. B.; Romão, W.; Eberlin, M. N. *Anal. and bio. chemistry*, v. 398, n. 1, p. 265-294, 2010.
- Cooks, R. G., Ouyang, Z. *Science*, v. 311, n. 5767, p. 1566-1570, 2006.
- Whu, C; Qian, K.; Walters, C. C.; Mennito, A. *Intern. Jour. Of Mass Spectrom*, v. 377, p.728-735, fev. 2015.
- Shi, R. Z.; El Taher, M.; Manicke, N. E.; Faix, J. D. *Clinica Chimica Acta*, v. 441, p. 99-104, 2015.
- Cody, R. B.; Laramée, J. A.; Durst, H. D. *Anal. Chem.*, v. 77, n. 8, p. 2297-2302, 2011.
- Astarita, G.; Paglia, G.; Yu, K. *Waters Corporation*, USA. September, 2015.
- Ahonen, L.; Fasciotti, M.; af Gennäs, G. B.; Kotiaho, T.; Daroda, R. J.; Eberlin, M.; Kostianen, R. *J. of Chromatog. A*, v. 1310, p. 133-137, 2013.
- Williams, M. D.; Zhang, X.; Hill Jr, H. H. *Jour. of proteome*, v. 14, n. 3, p. 1420-1431, 2015.
- Fasciotti, M.; Sanvido, G. B., Santos; V. G., Lalli, P. M.; Eberlin, M. N. *Jour. of Mass Spectrom*, v. 47, n. 12, p. 1643-1647, 2012.
- Barrère, C., Selmi, W., Hubert-Roux, M. *Polymer Chemistry*, v. 5, n. 11, p. 3576-3582, 2014.
- Tose, L. V.; Benigni, P.; Leyva, D.; Sundberg, A.; Ramírez, C. E.; Ridgeway, M. E.; Park, M. A.; Romão, W.; Jaffé, R.; Fernandez-Lima, F. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2018.
- Vaz, B. G.; Abdelnur, P. V.; Rocha, W. F. C.; Gomes, A. O; Pereira, R. C. L. *Energy & Fuels*, 2013, 27, 1873-1880.

Kanu, A.B.; Dwivedi, P.; Tam, M.; Matz, L.; Hill, H.H. *Jour. Of Mass Spectrom*, [s.l.], v. 43, n. 1, p.1-22, 16 jan. 2008.

Kuki, Á; Nagy, L.; Zsuga, M.; Kéki, S. *Atm. Env.*, v. 100, p. 74-77, 2015.

Pereira, T. M. C.; Vanini, G.; Tose, L. V.; Cardoso, F. M. R.; Fleming, F. P.; Rosa, P. T. V.; Thompson, C. J.; Castro, E. V. R.; Vaz, B. G.; Romão, W. *Fuel* 131, 49–58 (2013).

Kuwayama, K., Yamamuro, T., Tsujikawa, K. *Anal. and bio. chemistry*, v. 406, n. 19, p. 4789-4794, 2014.

Paglia, G. A. *Waters Corporation*, Milford, Massachusetts, USA. 2015.

Marshall, A. G. and Rodgers, R. P. *Acc. Chem. Res.*, 2004, 37, 53 – 59.

Marshall, A. G. and Rodgers, R. P. *PNAS*, 2008, 105, 18090-18095.

Dias, H. P.; Pereira, T. M. C.; Vanini, G.; Dixini, P. V.; Celante, V. G.; Castro, E.V.R.; Vaz, B. G.; Fleming, F. P.; Gomes, A. O.; Aquije, G. M. F.; Romão, W. *Fuel* 2014, 126, 85-95.

Pereira, T. M. C.; Vanini, G.; Oliveira, E. C. S.; Cardoso, F. M. R.; Fleming, F. P.; Neto Jr, A. C; *et al.* *Fuel* 2014;118:348–57.

Thanh, N. X; Hsieh, M; Philip, R. P. *Org Geochem* 1999, 30, 119–32.

Pereira, T. M. C.; Vanini, G.; Tose, L. V.; Cardoso, F. M. R.; Fleming, F. P.; Rosa, P. T. V.; Thompson, C. J.; Castro, E. V. R.; Vaz, B. G.; Romão, W. *Fuel* 2014, 131, 49-58.

Tose, L. V.; Cardoso, F. M. R.; Fleming, F. P.; Vicente, M. A.; Silva, S. R. C.; Aquije, G. M. F. V.; Vaz, B. G.; Romão, W. *Fuel* 2015, 153, 346-354.

Hsu, C. S.; Hendrickson, C. L.; Rodgers, R. P.; McKenna, A. M.; Marshall, A. G. *Journal of Mass Spectrom*, 2011, 46, 337-343.

Corilo, Y. E.; Vaz, B. G.; Simas, R. C.; Nascimento, H. D. L.; Klitzke, C. F.; Pereira, R. C. L.; Bastos, W. L.; Santos, E. V. N.; Rodgers, R. P.; Eberlin, M. N. *Anal. Chem*, 2010, 82, 3990-3996.

Benassi, M; Berisha, A; Romão, W; Babayev, E; Rompp, A; Spengler, B. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2013;27:825–34.

Campbell, J. L; Crawford, K. E; Kenttamaa, H. I. *Anal Chem*, 2004,76(4),959–63.

Zhou, X; Shi, Q; Zhang, Y; Zhao, S; Zhang, R; Chung, KH; *et al. Anal Chem* 2012, 84, 3192–9.

Zhou, X; Zhang, Y; Zhao, S; Chung, K. H; Xu, C; Shi, Q. *Energy Fuels* 2014, 28, 417–22.

Gao, J; Owen, B. C; Borton, D. J; Jin, Z; Kenttämä, H. I. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2012, 23, 816–22.

Nyadong, L; Quinn, J. P; Hsu, C. S; Hendrickson, C. L; Rodgers, R. P; Marshall, A. G. *Anal Chem* 2012;84:7131–7.

Tose, L. V; Cardoso, F. M. R; Fleming, F. P; Vicente, M. A; Silva, S. R. C; Aquije, G. M. F. V; Vaz, B. G; Romão, W. *Fuel* (Guildford) 2015;153: 346-354.

Romão, W.; Tose, L. V.; Vaz, B. G.; Sama, S. G.; Lobinski, R.; Giusti, P.; Carrier, H.; Bouyssiere, B. *Am Soc for Mass Spectrom*, 2016, 27, 182-185.

Ly, J.; Wei, X.; Wang, Y.; Yu, L.; Zhang, D.; Yue, X.; Wang, T.; Liu, J.; Zong, Z.; Fan, X.; Zhao, Y. *Fuel* 2014, 129, 162-167.

Wang, Y.; Wei, X.; Liu, J.; Li, Z.; Wang, S.; Wang, Y.; Kang, G.; Fan, X.; Zong, Z. *Fuel* 2014, 128, 302-313.

ASTM D1298–99 Standard test method for API degree; 2005

ASTM D7042–04 Standard test method for dynamic viscosity and density of liquids by Stabinger viscometer (and the calculation of kinematic viscosity); 2004.

Dias, H. P; Dixini, P. V; Almeida, L. C. P; Vanini, G; Castro, E. V. R; Aquije, G. M. F. V; Gomes, A. O; Moura, R. R; Lacerda, V. J; Vaz, B. G; Romão, W. *Fuel* 2015;139:328–36.

Pereira, T. M. C; Vanini, G; Tose, L. V; Cardoso, F. M. R; Fleming, F. P; Rosa, P. T. V; Thompson, C. J; Castro, E. V. R; Vaz, B. G; Romão, W. *Fuel* 2014;131:49–58.

Fussell, R. J.; Chan, D.; Sharman, M. *Anal Chem*, 2010, 29, 1326-1335.

Coto, B; Martos, C; Espada, J. J; Robustillo, M. D; Peña, J. L. *Fuel* 2010, 89, 1087–94.

Fussell, R. J. *Anal Chem*, 2015, 37, 1499-1503.

Dalmaschio, G. P; Malacarne, M. M; Almeida, V. M. D. L; Pereira, T. M. C; Gomes, A. O; de Castro, E. V. R; *et al. Fuel* 2014;115:190–202.

Colati, K. A. P.; Dalmaschio, G. P.; de Castro, E. V. R.; Gomes, A. O.; Vaz, B. G.; Romão W. *Fuel* 2013;108:647–55.

Vasconcelos, G. A.; Pereira, R. C. L.; Santos, C. F.; Carvalho, V. V.; Tose, L. V.; Romão, W.; Vaz, B. G. *Intern J. Mass Spectrom*, in press.

Herrera, L. C.; Grossert, J. S.; Ramaley, L. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 19, 1926-1941, 2008.

Mosqueta, J. T. Marihuana - cannabis - aspectos toxicologicos, clinicos, sociales y potenciales usos terapeuticos. UNODC. 2015.

Paglia, G. A. *Waters Corporation*, Milford, Massachusetts, USA. 2015.

Kanu, A. B.; Dwivedi, P.; Tam, M.; Matz, L.; Hill, H. H. *J. of Mass Spectrom* [s.l.], v. 43, n. 1, p.1-22, 16 jan. 2008. Wiley-Blackwell.

Shvartsburg, A. A.; Smith, R. D. *Anal Chem*, v. 80, n. 24, p. 9689-9699, 2008.

Fasciotti, M.; Lalli, P. M.; Heerdt, G.; Steffen, R. A.; Corilo, Y. E.; Sá, G. F.; Dadora, R. J.; Reis, F. A. M.; Morgon, N. H.; Pereira, R. C. L.; Eberlin, M. N; Klitzke, C. F. *Intern J. for Ion Mob. Spectrom.*, v. 16, n. 2, p. 117-132, 2013.

Elsohly, M. A.; Slade, Desmond. *Life Sciences*, v. 78, n. 5, p. 539-548, 2005.

Bordin, D. C. *et al. Quím. Nova*, v. 35, n. 10, p. 2040-2043, 2012.

Schwoppe, D. M.; Scheidmeiler, K. B.; Huestis, M. A. *Anal and bioanal chem*, v. 401, n. 4, p. 1273-1283, 2011.

Watanabe, K.; Yamaori, S.; Funahashi, T.; Kimura, T.; Yamamoto, I. *Life Science*, v. 80, n. 15, p. 1415-1419, 2007.

Halldin, M. M.; Carlsson, S.; Kanter, S. L.; Widman, M.; Agurell, S. *Arzneimittel-Forschung*, v. 32, n. 7, p. 764-768, 1981.

Wall, M. E.; Sadler, B. M.; Brine, D.; Taylor, H.; Perez-Reyes, M. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 34, n. 3, p. 352-363, 1983.

Lacroix, C.; Sausseureau, E. *J. of Chromatog. B*, v. 905, p. 85-95, 2012.

Grauwliler, S. B.; Scholer, A.; Drewe, J. *J. of Chromatog. B*, v. 850, n. 1, p. 515-522, 2007.

Williams, M. D.; Zhang, X.; Belton, A. S.; Xian, L.; Huso, T.; Park, J. J.; Siems, W. F.; Gang, D. R.; Resar, L. M. S.; Reeves, R.; Hill Jr, H. H. *Journal of proteome research*, v. 14, n. 3, p. 1420-1431, 2015.

Nascimento, I. R.; Costa, H. B.; Souza, L. M.; Soprani, L. C.; Merlo, B. B.; Romão, W. *Anal Methods*, v. 7, n. 4, p. 1415-1424, 2015.

Elsohly, M. A. *Springer Science & Business Media*, 2007.

Eiras, M. M.; de Oliveira, D. N.; Ferreira, M. S.; Benassi, M.; Cazenave, S. O. S.; Catharino, R. R. *Anal Methods* 6:1350–1352, 2014.

Elsohly, M. A.; Slade, D. *Life science*, v. 78, n. 5, p. 539-548, 2005.

Bordin, D. C.; Messias, M.; Lanaro, R.; Cazenave, S. O. S.; Costa, J. L. *Quím. Nova*, v. 35, n. 10, p. 2040-2043, 2012.

Costa, A. F.; *Farmacognosia*, 5a ed.; Fundação Calouste Gulbenkion: Lisboa, 2002.

Andrews, R.; Paterson, S. A. *Forensic science international*, v. 222, n. 1, p. 111-117, 2012.

Kuwayama, K.; Yamamuro, T.; Tsujikawa, K.; Miyaguchi, H.; Kanamori, T.; Iwata, Y. T.; Inoue, H. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 406, n. 19, p. 4789-4794, 2014.

Fasciotti, M.; Sanvido, G. B.; Santos, V. G.; Lalli, P. M.; McCullagh, M.; Sá, G. F.; Daorda, R. J.; Peter, M. G.; Eberlin, M. N. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 47, n. 12, p. 1643-1647, 2012.

Dussy, F. E.; Hamberg, C.; Luginb'ul, M.; Schwerzmann, T.; Briellman, T. *Forensic Sci. Int.* 2005, 3, 149.

Zuardi, A. W.; Crippa, J. A. S.; Hallak, J. E. C.; Moreira, F. A.; Guimarães, F. S.; *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2006, 39, 421.

Brasil. Lei Antidrogas (2006). Lei Antidrogas. – Brasília : Senado Federal, Subsecretaria de Edições Técnicas, 2007.

United Nations Office On Drugs And Crime – UNODC, 2015 – Vienna. *World Drug Report*. Disponível em: <<http://www.unodc.org/unodc/index.html>>, Acesso em: 20 jan. 2016.

United Nations Office on Drugs and Crime - UNODC. *Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products*. New York, 2015.

- Benigni, P.; Marin, R.; Fernandez-Lima, F. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry*, 2015. 18(3-4): p. 151-157.
- Stenson, A.C.; Marshall, A.G.; Cooper, W.T. *Analytical Chemistry*, 2003. 75(6): p. 1275-1284.
- Bae, E. *et al. Energy & Fuels*, 2010. 24(4): p. 2563-2569.
- Hertkorn, N., *et al. Biogeosciences*, 2016. 13(8): p. 2257-2277.
- Witt, M.; Fuchser, J.; Koch, B. P. *Analytical Chemistry*, 2009. 81(7): p. 2688-2694.
- Jaffé, R.; Gallardo, M.T. *Organic Geochemistry*, 1993. 20(7): p. 973-984.
- McDaniel, E.W.; Mason, E.A. *Wiley Series in Plasma Physics*. 1973, New York: John Wiley and Sons, Inc., New York. 381.
- Gillig, K.J.; Russell, D.H. *A periodic field focusing ion mobility spectrometer*, in *Patent Cooperation Treaty Int. Appl. WO0165589*. 2001, The Texas A & M University System. p. 36.
- Gillig, K.J., *et al. An electrostatic focusing ion guide for ion mobility-mass spectrometry*. *Int. J. Mass Spectrom.*, 2004. 239(1): p. 43-49.
- Silveira, J.A., *et al. International Journal of Mass Spectrometry*, 2010. 296(1-3): p. 36-42.
- Guo, Y., *et al. Analytical Chemistry*, 2004. 77(1): p. 266-275.
- Koeniger, S.L., *et al. Anal. Chem.*, 2006. 78(12): p. 4161-4174.
- Kurulugama, R.T., *et al. Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2009. 20(5): p. 729-737.
- Glaskin, R.S.; Valentine, S.J.; Clemmer, D.E. *Analytical Chemistry*, 2010. 82(19): p. 8266-8271.
- Kolakowski, B.M.; Mester, Z.; *Analyst*, 2007. 132(9): p. 842-864.
- Hernandez, D.R., *et al. Analyst*, 2014. 139(8): p. 1913-1921.
- Fernandez-Lima, F.A.; Kaplan, D.A.; Park, M.A. *Rev. Sci. Instr.*, 2011. 82(12): p. 126106.
- Fernandez-Lima, F. *et al. Int. J. Ion Mobility Spectrom.*, 2011. 14(2): p. 93-98.

Benigni, P.; *et al. J. Vis. Exp.*, 2017. 121: p. e55352.

Fasciotti, M.; *et al. Energy & Fuels*, 2013. 27(12): p. 7277-7286.

Benigni, P., *et al. Energy & Fuels*, 2016. 30(12): p. 10341-10347.

Silveira, J.A. *et al. International Journal of Mass Spectrometry*, 2017. 413: p. 168-175.

Hernandez, D.R. *et al. Analyst*, 2014.

Fernandez-Lima, F.A.; Kaplan, D.A.; Park, M.A. *Review of Scientific Instruments*, 2011. 82(12): p.

Benigni, P.; Fernandez-Lima, F. *Anal Chem*, 2016. 88(14): p. 7404-12.

Pu, Y. *et al. Analytical Chemistry*, 2016. 88(7): p. 3440-3443.

Ridgeway, M.E. *et al. Int J Ion Mobil Spectrom*, 2016. 19(2): p. 77-85.

Benigni, P. *et al. Environ Sci Technol*, 2017. 51(11): p. 5978-5988.

Benigni, P. *et al. Analytical Chemistry*, 2018.

Schenk, E. R. *et al. Anal. Chem.* 2014. 86(2): p. 1210-1214.

Schenk, E. R. *et al. Anal. Chem.*, 2014. 86(4): p. 2019-24.

Benigni, P. *et al. Environmental Science & Technology*, 2017. 51(11): p. 5978-5988.

Stubbins, A., *et al. Limnology and Oceanography*, 2010. 55(4): p. 1467-1477.

Blackburn, J.W.T. *et al. Analytical Chemistry*, 2017. 89(8): p. 4382-4386.

Wang, C.F. *et al. Rsc Advances*, 2017. 7(33): p. 20677-20684.

Kim, S.; Kramer, R.W.; Hatcher, P.G. *Analytical Chemistry*, 2003. 75(20): p. 5336-5344.

United Nations Office on Drugs and Crime – UNODC, 2014 – Vienna. World Drug Report. Retrieved 20 Jan 2015, from <http://www.unodc.org/wdr2014/>.

Boleda, M. R.; Galceran, M. T.; Ventura, F. *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 38–48.

Elsohly, M. A.; Slade, D. *Life Sci.* 78 (2005) 539-48.

Zulfiqar, F.; Ross, S. A.; Slade, D.; Ahmed, S. A.; Radwan, M. M.; Ali, Z.; Khan, I. A.; Elsohly, M. A. *Tetrahedron Lett.* 53 (2012) 3560-3562.

Yamauchi, T.; Shoyama, Y.; Aramaki, H.; Azuma, T.; Nishioka, I. *Chem. Pharm. Bull.* 15 (1967) 1075.

Santos, N. A.; Souza, L. M.; Domingos, E.; França, H. S.; Lacerda Jr., V.; Beatriz, A.; Vaz, B. G.; Rodrigues, R. R. T.; Carvalho, V. V.; Merlo, B. B.; Kuster, R. M.; Romão, W. *Foren. Chem.* 1 (2016) 13-21.

Zuardi, A. W.; Crippa, J. A. S.; Hallak, J. E. C.; Moreira, F. A.; Guimarães, F. S. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39 (2006) 421.

Nascimento, I. R.; Costa, H. B.; Souza, I. M.; Soprani, L. C.; Merlo, B. B.; Romão, W. *Anal. Methods* 7 (2015) 1415-1424.

Dussy, F. E.; Hamberg, C.; Luginbul, M.; Schwerzmann, T.; Briellman, T. *Forensic Sci. Int.* 3 (2005) 149.

Bijlsma, L.; Sancho, J. V.; Hernández, F.; Niessen, W. *J. Mass Spectrom.* 46 (2011) 865-875.

Jung, J.; Meyer, M. R.; Maurer, H. H. *J. Mass Spectrom.* 44 (2009) 1423-1433

Mosquera, J. T. Marihuana - cannabis - aspectos toxicologicos, clinicos, sociales y potenciales usos terapeuticos. UNODC. 2015.

Schwoppe, D. M.; Scheidweiler, K. B.; Huestis, M. A. *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 1273-1283.

Kuwayama, K.; Yamamuro, T.; Tsujikawa, K.; Miyaguchi, H.; Kanamori, T.; Iwata, Y. T.; Inoue, H. *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 4789-4794.

Lacroix, C.; Saussereau, E. *J. Chromatogr. B* 905 (2012) 85-95.

Grauwiler, S. B.; Scholer, A.; Drewe, J. *J. Chromatography B* 850 (2007) 515-522.

Kanu, A. B.; Dwivedi, P.; Tam, M.; Matz, I.; Hill, H. H. *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 1-22.

Shvartsburg, A. A.; Smith, R. D. *Anal. Chem.* 80 (2008) 9689-9699.

Gwak, S.; Almirall, J. R. *Drug Test. Anal.* 7 (2015) 884-893.

Ahonen, L.; Fasciotti, M.; Gennäs, G. B.; Kotiaho, T.; Daroda, R. J.; Eberlin, M. N.; Kostianinen, R. *J. Chromatogr. A* 1310 (2013) 133-137.

Williams, M. D.; Zhang, X.; Belton, A. S.; Xian, L.; Huso, T.; Park, J. J.; Siems, W. F.; Gang, D. R.; Resar, I. M. S.; Reeves, R.; Hill Jr., H. *J. Proteome Res.* 14 (2015) 1420-1431.

Fasciotti, M.; Sanvido, G. B.; Santos, V. G.; Lalli, P. M.; McCullagh, M.; de Sá, G. F.; Daroda, R. J.; Peter, M. G.; Eberlin, M. N. *J. Mass Spectrom.* 47 (2012) 1643-1647.

Romão, W.; Lalli, P. M.; Franco, M. F.; Sanvido, G.; Schwab, N. V.; Lanaro, R.; Costa, J. L.; Sabino, B. D.; Bueno, M. I. M. S.; Sá, G. F.; Daroda, R. J.; Souza, V.; Eberlin, M. N. *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 3053-3064.

Armenta, S.; Garrigues, S.; La Guardia, M.; Brassier, J.; Alcalá, M.; Blanco, M.; Perez-Alfonso, C.; Galipienso, N. *Drug Test. Anal.* 7 (2015) 280-289.

Lewis, G. S.; Turner, C. E. *J. Pharm. Sci.* 67 (1978) 876.

Elsohly, M. A.; *Forensic science and medicine*. Humana Press, 2007

Relatório anual Departamento de Polícia Federal. Relatório de atividades – 2008. Retrieved 01 Mar. 2015, from <http://www.dpf.gov.br/institucional/relatorio-anual-pf/>

Wall, M. E.; Sadler, B. M.; Brine, D.; Taylor, H.; Perez-Reyes, M. *Clin. Pharmacol. Ther.* 34 (1983) 352-363.

Watanabe, K.; Yamaori, S.; Funahashi, T.; Kimura, T.; Yamamoto, I. *Life Sci.* 80 (2007) 1415-1419.

Fasciotti, M.; Lalli, P. M.; Heerdt, G.; Steffen, R. A.; Corilo, Y. E.; Sá, G. F.; Dadora, R. J.; Reis, F. A. M.; Morgon, N. H.; Pereira, R. C. L.; Eberlin, M. N.; Klitzke, C. F. *Int. J. Ion Mobility Spectrom.* 16 (2013) 117-132.

APÊNDICE

Capítulo 5.

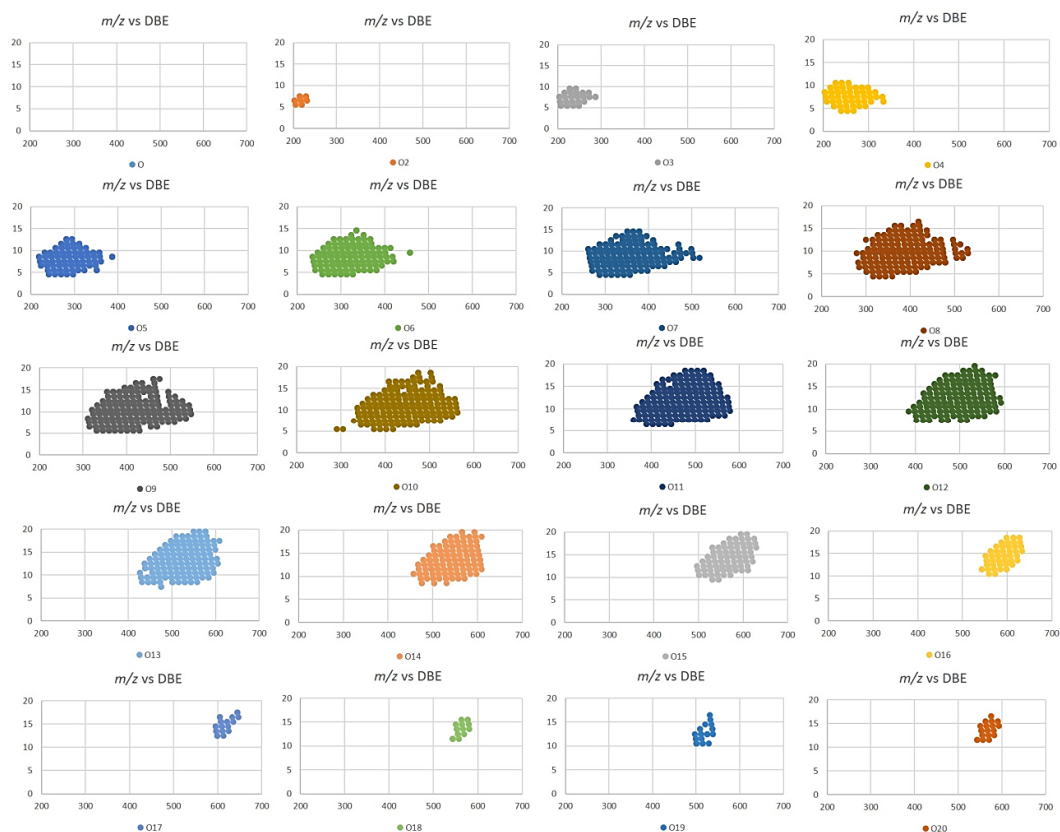


Figura 5.11 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e DBE para OKA-L por TIMS-FT-ICR MS.

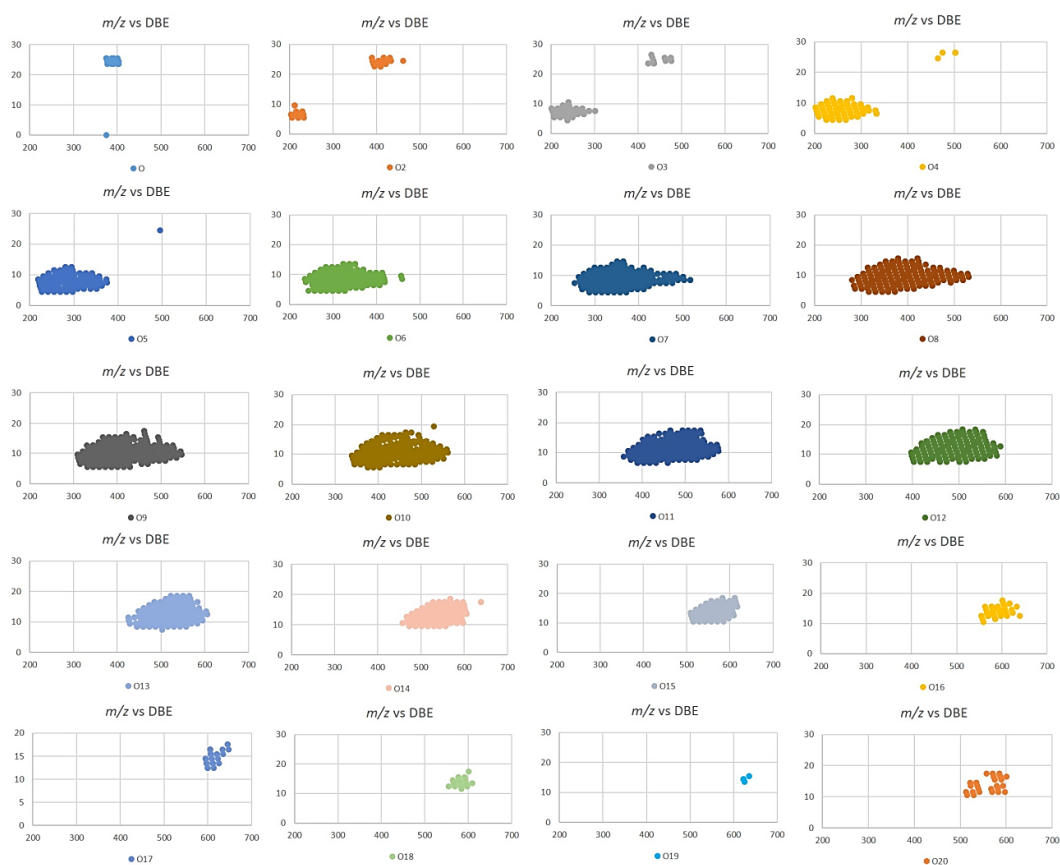


Figura 5.12 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e DBE para OKA-S por TIMS-FT-ICR MS.

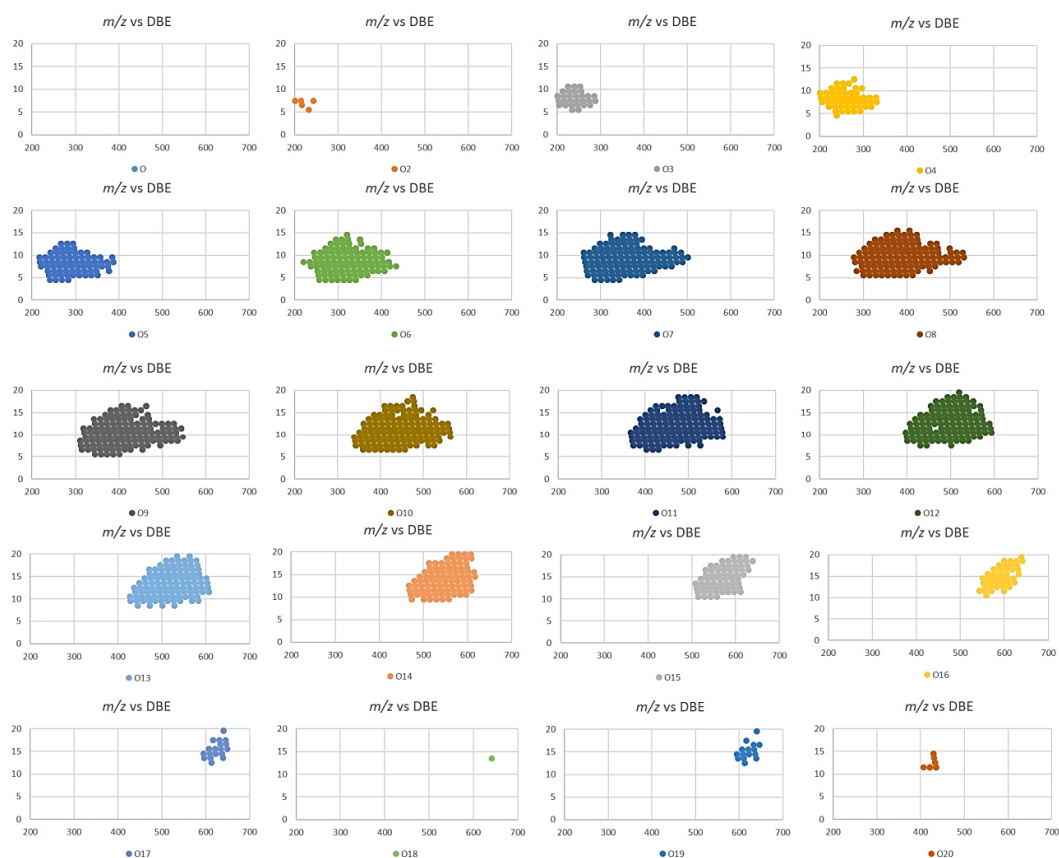


Figura 5.13 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e DBE para PAN-L por TIMS-FT-ICR MS.

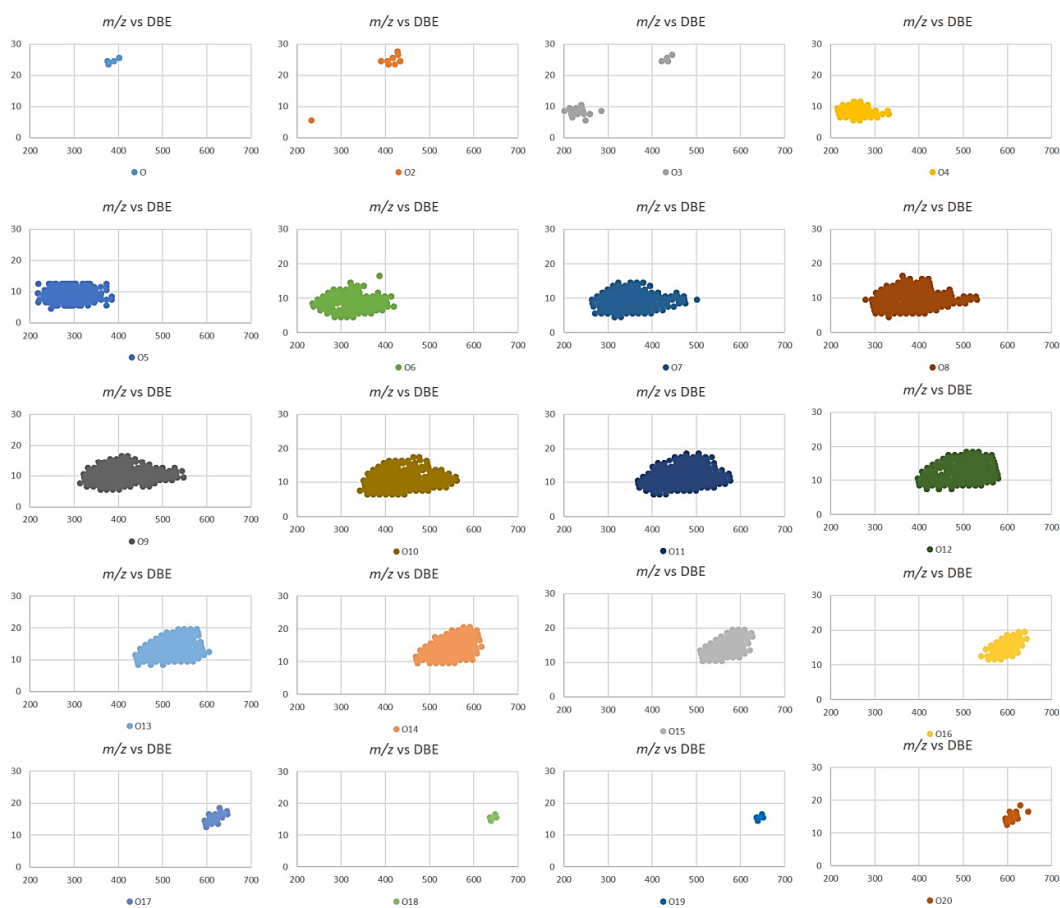


Figura 5.14 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e DBE para PAN-S por TIMS-FT-ICR MS.

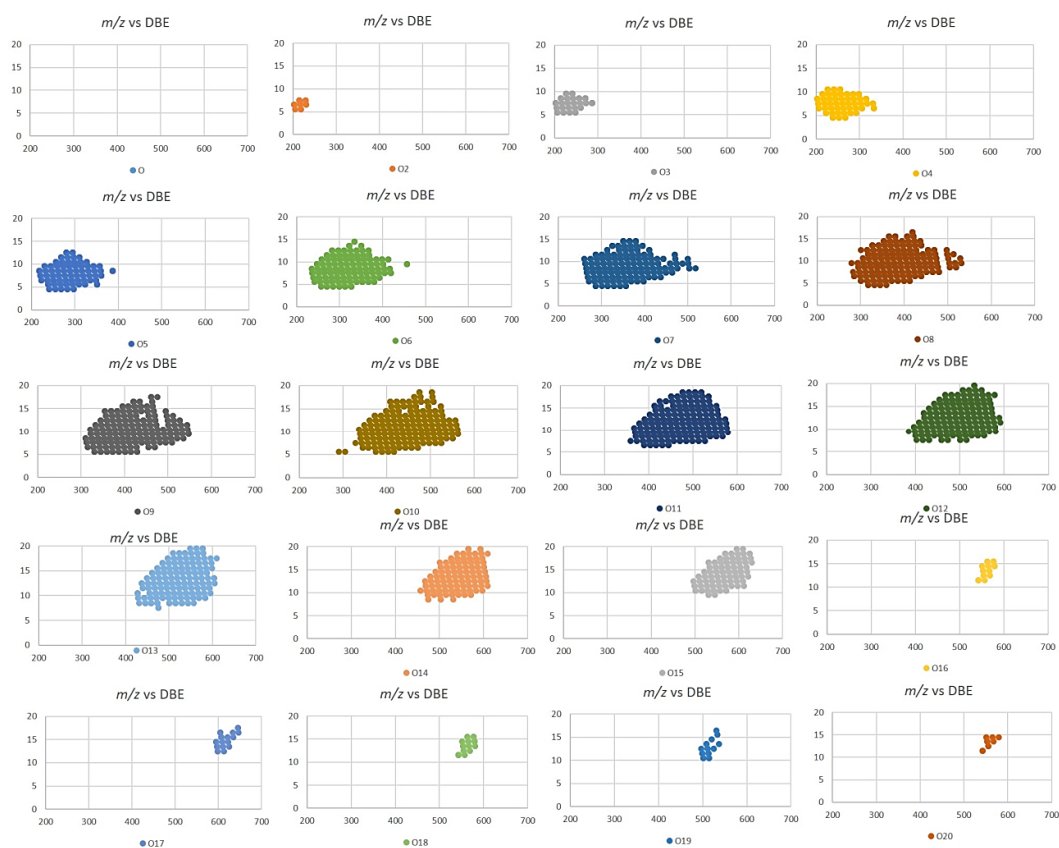


Figura 5.15 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e DBE para FCE-L por TIMS-FT-ICR MS.

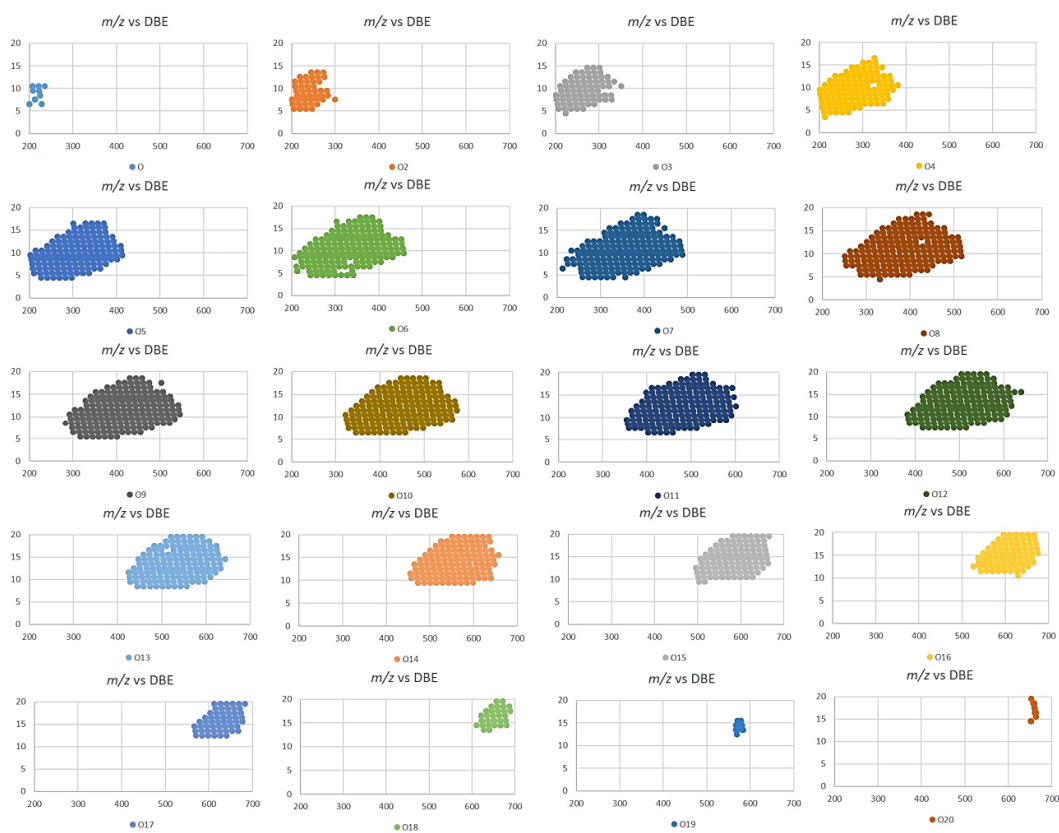


Figura 5.16 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e DBE para FCE-S por TIMS-FT-ICR MS.

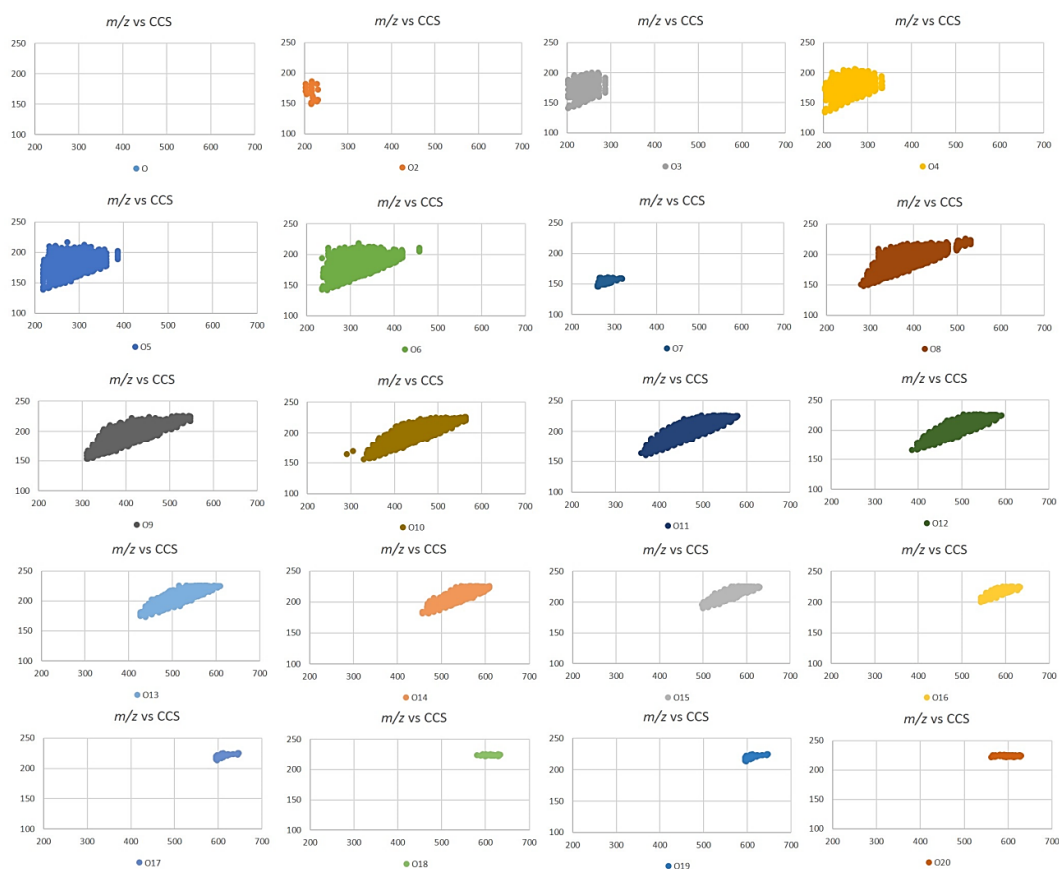


Figura 5.17 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e CCS para OKA-L por TIMS-FT-ICR MS.

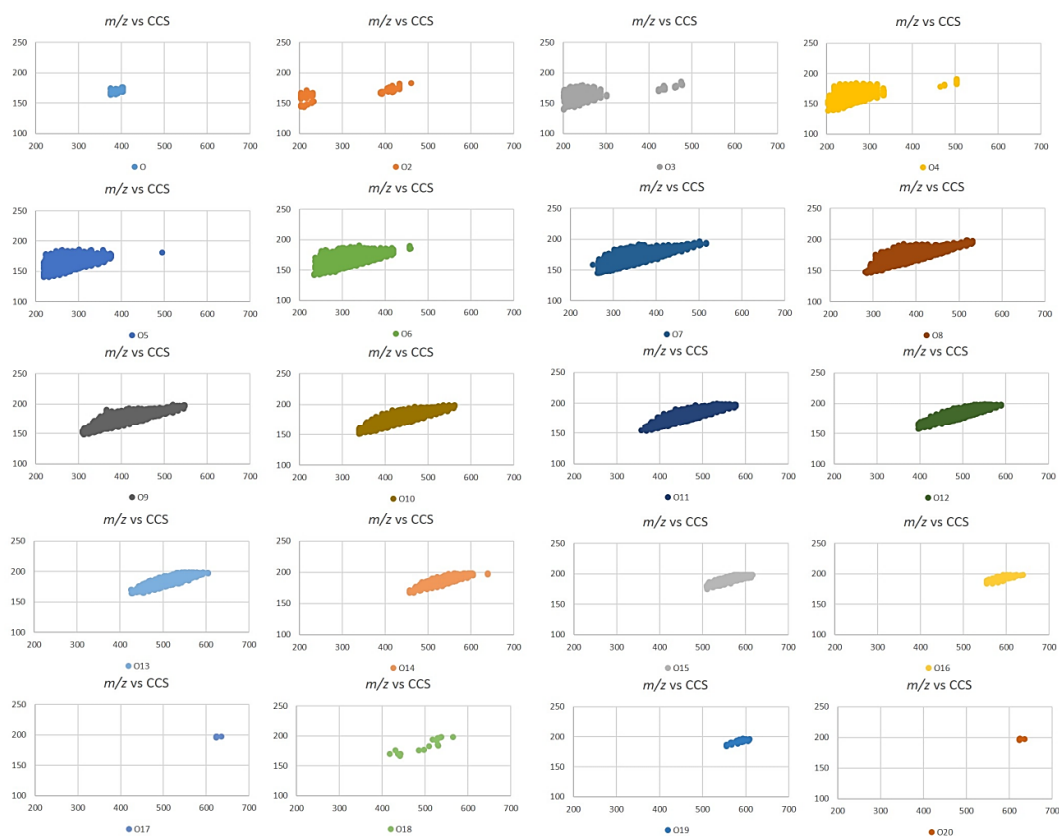


Figura 5.18 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e CCS para OKA-S por TIMS-FT-ICR MS.

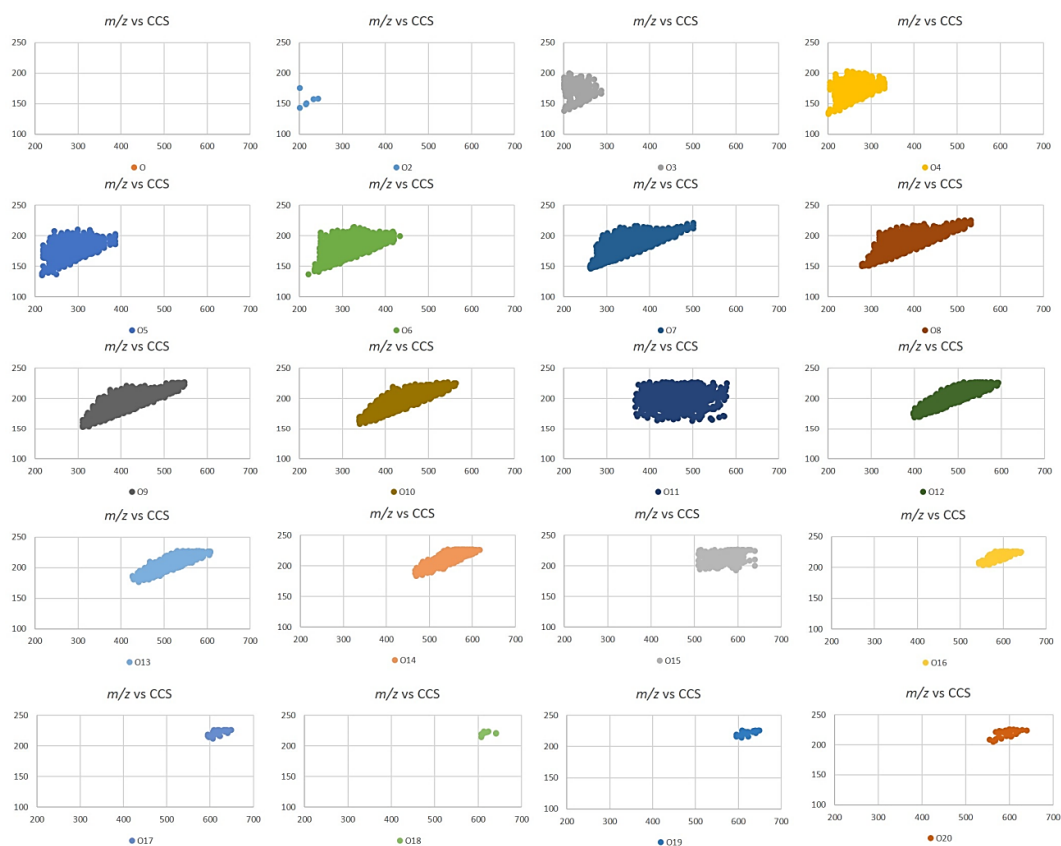


Figura 5.19 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e CCS para PAN-L por TIMS-FT-ICR MS.

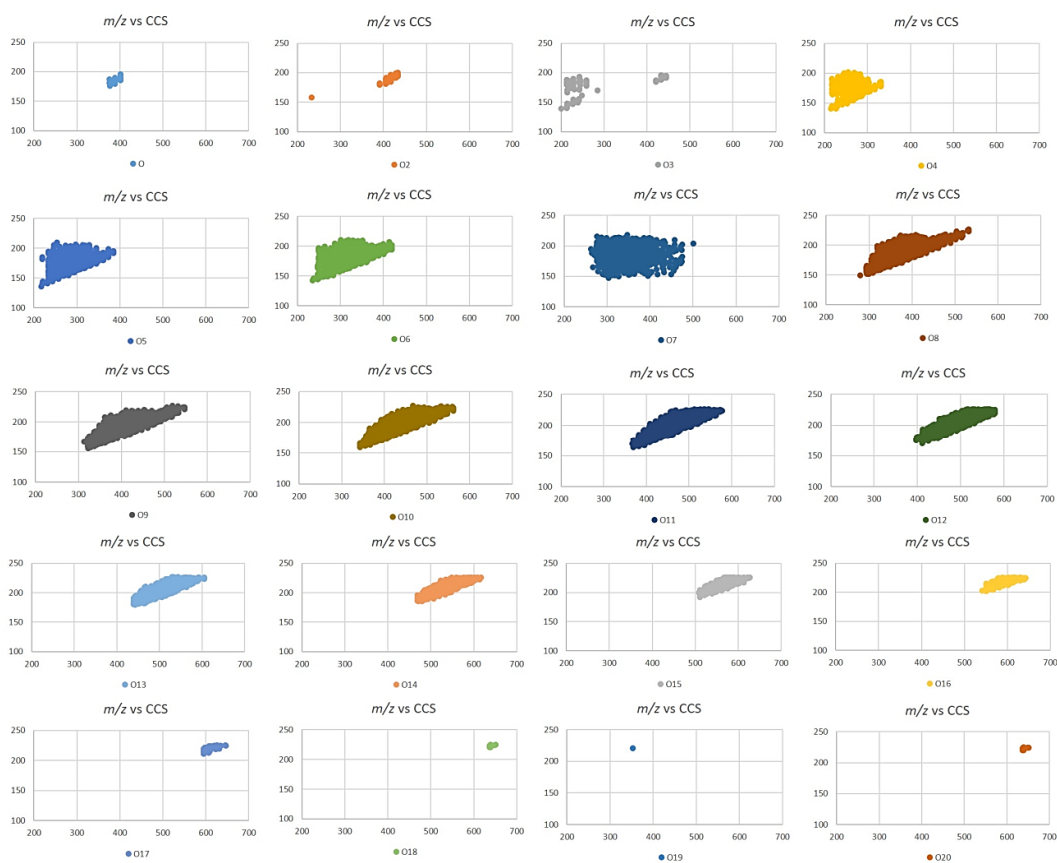


Figura 5.20 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e CCS para PAN-S por TIMS-FT-ICR MS.

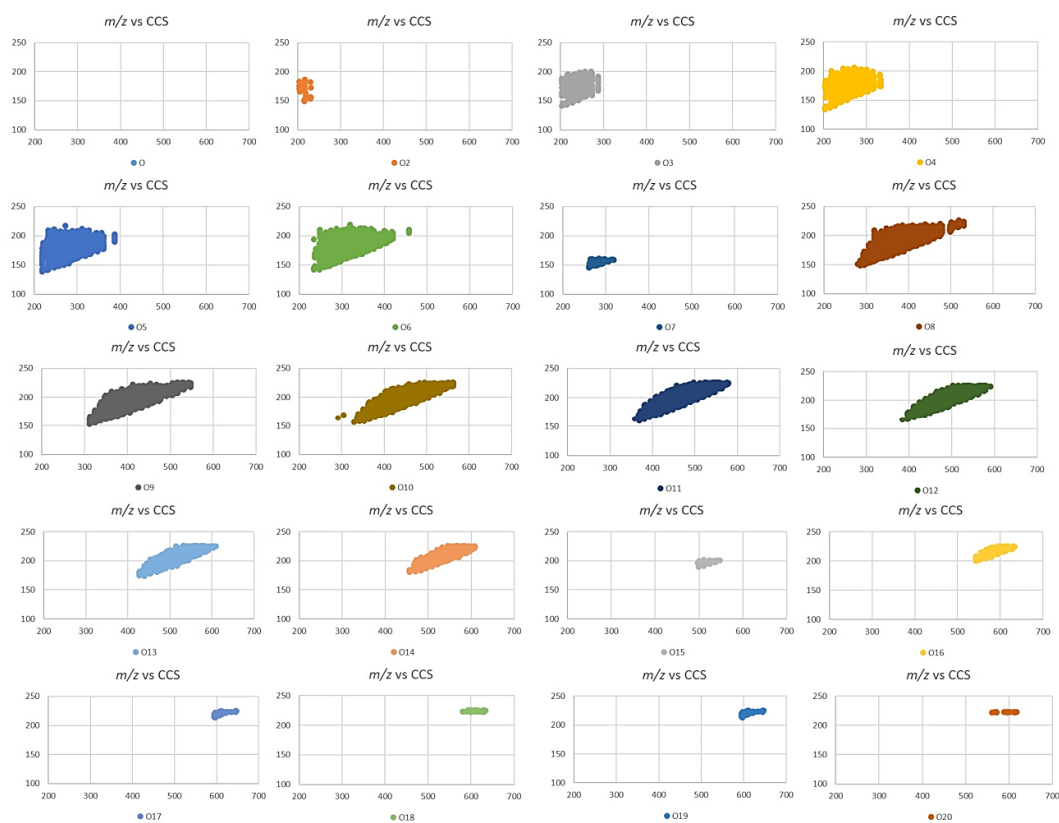


Figura 5.21 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e CCS para FCE-L por TIMS-FT-ICR MS.

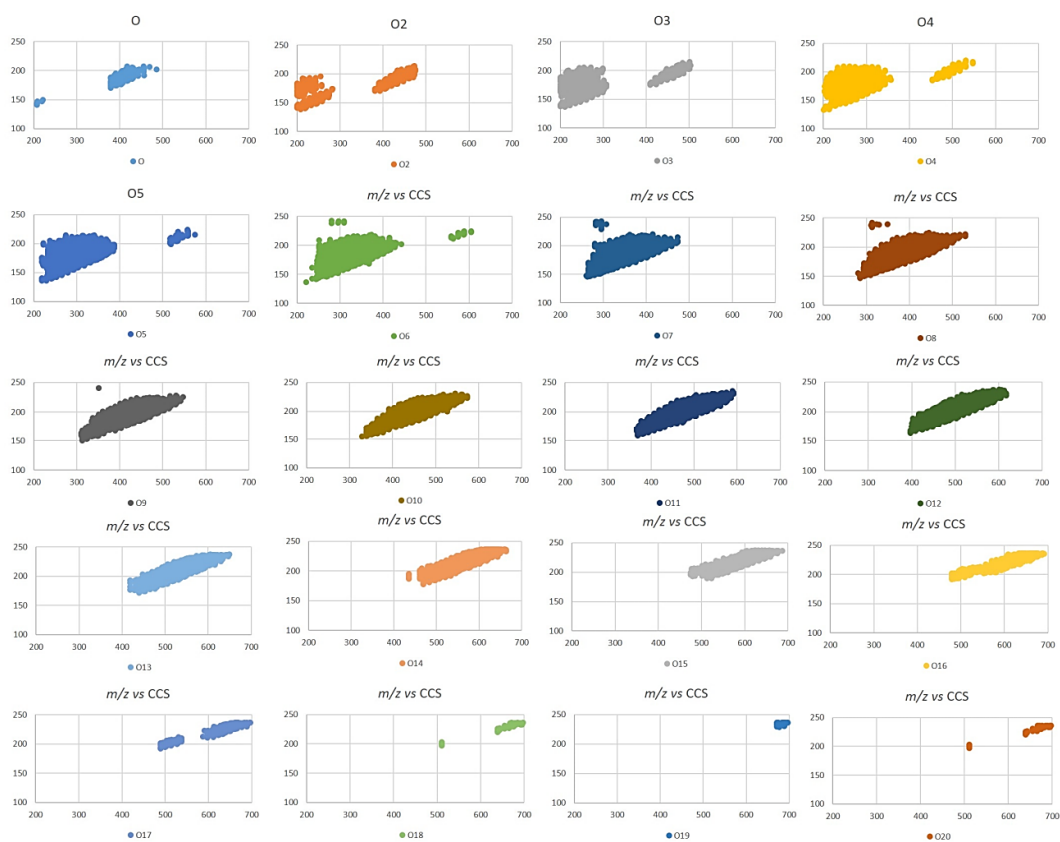


Figura 5.22 Distribuição de compostos oxigenados em função do m/z e CCS para FCE-S por TIMS-FT-ICR MS.
